

PCT

EP 18092 (2)

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

3/3

(51) 国際特許分類6
C12N 15/00

A1

(11) 国際公開番号

WO98/33897

(43) 国際公開日

1998年8月6日(06.08.98)

(21) 国際出願番号

PCT/JP98/00444

(22) 国際出願日

1998年2月3日(03.02.98)

(30) 優先権データ

特願平9/20632

1997年2月3日(03.02.97)

JP

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

株式会社 分子バイオフォトニクス研究所

(LABORATORY OF MOLECULAR BIOPHOTONICS)[JP/JP]

〒434-8555 静岡県浜北市平口5000番地 Shizuoka, (JP)

(72) 発明者 ; および

(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)

飯田ゆかり (IIDA, Yukari)[JP/JP]

腰本裕之 (KOSHIMOTO, Hiroyuki)[JP/JP]

近藤 聡 (KONDO, Satoshi)[JP/JP]

辻 明彦 (TSUJI, Akihiko)[JP/JP]

〒434-8555 静岡県浜北市平口5000番地

株式会社 分子バイオフォトニクス研究所内 Shizuoka, (JP)

(74) 代理人

弁理士 長谷川芳樹, 外 (HASEGAWA, Yoshiki et al.)

〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号

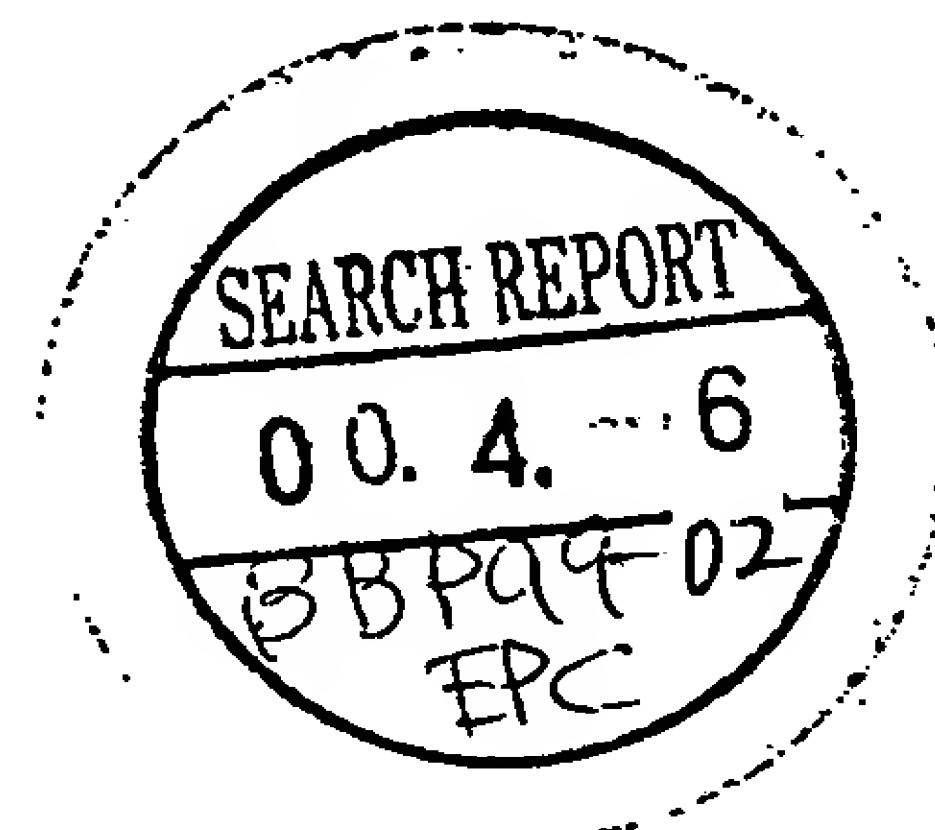
京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類

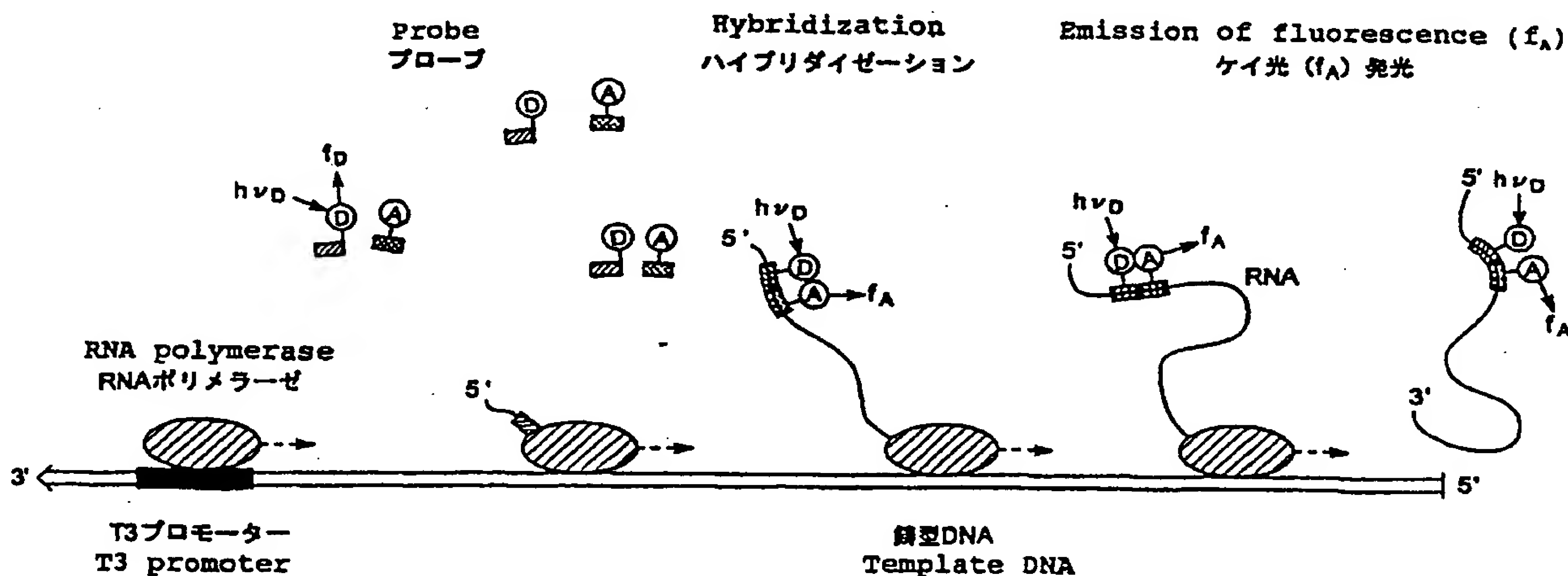
国際調査報告書

請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。



(54) Title: METHOD FOR MONITORING TRANSCRIPTIONAL SYNTHESIS OF RNA AND APPARATUS THEREFOR

(54) 発明の名称 RNA転写合成モニター方法及びその装置



(57) Abstract

A method for monitoring the transcriptional synthesis of an RNA by measuring the fluorescence of a probe consisting of a pair of oligonucleotide probes, i.e., a donor probe labeled with an energy donor fluorescent molecule and an acceptor probe labeled with an energy acceptor fluorescent molecule, and having a base sequence hybridizable with a part of the base sequence of the transcriptionally synthesized RNA to thereby confirm the initiation and completion of the transcriptional synthesis of the RNA and the synthesis of the full-length RNA.

(57) 要約

本発明は、RNA転写合成モニター方法及びその装置を提供する。すなわち、本発明は、転写合成されたRNAの塩基配列の一部に連続してハイブリダイズする塩基配列を有する2種類1組のオリゴヌクレオチドプローブであって、エネルギードナー蛍光分子でラベル化されたドナープローブと、エネルギーアクセプター蛍光分子でラベル化されたアクセプタープローブとからなるプローブの蛍光を測定することにより、RNA転写合成反応の、開始、終了及び完全長のRNAの合成の確認をモニターするものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|-----------|----|----------|----|------------|
| AL | アルバニア | FI | フィンランド | LT | リトアニア | SN | セネガル |
| AM | アルメニア | FR | フランス | LU | ルクセンブルグ | SD | スーダン |
| AT | オーストリア | GB | イギリス | LV | ラトヴィア | TD | チャド |
| AU | オーストラリア | BE | ベルギー | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| AZ | アゼルバイジャン | CH | スイス | MD | モルドバ | TJ | タジキスタン |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | DE | ドイツ | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BB | バハマ | EE | エストニア | MK | マケドニア共和国 | TR | トルコ |
| BB | バングラデシュ | EG | エジプト | ML | マリ | TT | トリニダード・トバゴ |
| BB | バングラデシュ | GR | ギリシャ | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| BB | バングラデシュ | GU | グアム | MR | モーリタニア | UG | ウガンダ |
| BB | バングラデシュ | IE | アイルランド | MW | マラウイ | US | 米国 |
| BB | バングラデシュ | IL | イスラエル | MX | メキシコ | UZ | ウズベキスタン |
| BB | バングラデシュ | IN | インド | NE | ネパール | VN | ベトナム |
| BB | バングラデシュ | IT | イタリア | NL | オランダ | ZW | ジンバブエ |
| BB | バングラデシュ | JP | 日本 | NO | ノルウェー | | |
| BB | バングラデシュ | KE | ケニア | NZ | ニュージーランド | | |
| BB | バングラデシュ | KR | 韓国 | PL | ポーランド | | |
| BB | バングラデシュ | KG | キルギス | PT | ポルトガル | | |
| BB | バングラデシュ | KZ | カザフスタン | RO | ルーマニア | | |
| BB | バングラデシュ | LA | ラオス | RU | ロシア | | |
| BB | バングラデシュ | LC | セント・ルシア | SE | スウェーデン | | |
| BB | バングラデシュ | LI | リヒテンシュタイン | SG | シンガポール | | |
| BB | バングラデシュ | LR | リベリア | SK | スロバキア | | |
| BB | バングラデシュ | LS | レソト | SL | シエラ・レオネ | | |

明細書

RNA転写合成モニター方法及びその装置

技術分野

5 本発明は、RNA転写合成モニター方法及びその装置に関する。

背景技術

タンパク質は DNA の塩基配列を写しとった RNA の塩基配列をもとに、リボソーム上で合成される。転写反応はタンパク質合成に至る最初の段階であり、細胞の核内に存在する DNA の塩基配列を写し取って RNA を合成する過程をいう。具体的には、DNA を鋳型にして相補的な RNA (アデニンはウラシルに、グアニンはシトシン) を 5'から 3'の方向に合成する反応である。

10 RNA 合成を担う RNA ポリメラーゼは、プロモーターとよばれる DNA 上の特定の塩基配列に結合した後、鋳型 DNA 上の転写開始部位から DNA の塩基と相補的なヌクレオチド三リン酸 (NTP) を取り込んで RNA を合成する。転写開始部位から数ヌクレオチド重合した後は、安定な重合反応が続き、RNA 鎖はさらに伸長されて DNA の対合から離れる。この一連の重合反応は DNA 上の特定の終結配列が現れるまで続く。

15 インビトロ転写反応は、細胞内の転写のメカニズムを利用して試験管内で簡単に RNA を合成する方法であり RNA ポリメラーゼとその補助因子、基質 NTP 及び鋳型 DNA を必要とする。

20 近年では転写補助因子を必要としない T7、T3、SP6 ポリメラーゼを利用したインビトロ転写反応も多く利用されている。T7、T3、SP6 ポリメラーゼを用いたインビトロ転写反応は、各プロモーターの下流に鋳型となる DNA 断片を導入し、各プロモーターを特異的に認識する RNA ポリメラーゼを用いて転写反応を行い、25 目的の RNA 鎖を合成する方法である。

インビトロ転写反応は、自動合成機では困難な長鎖 RNA をはじめキャップ構造やイントロンを導入した RNA を合成することも可能であり、これらの RNA は、インビトロ翻訳の鋳型 RNA、ハイブリダイゼーション用のプローブとして広く利用されている。キャップ構造が付加された RNA やイントロンが導入された RNA は、
5 転写産物の末端や介在配列を解析するために用いられている (Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. 1996)。

このようにインビトロ転写 RNA 合成反応は多くの研究分野で利用されているが、一般に、インビトロ転写反応を正常に進行させるためには、鋳型として使用する DNA 上においてプロモーターが適切な位置に組み込まれていること、プロ
10 モーターと RNA ポリメラーゼの組み合わせが適切であることなど、いろいろな条件が正確に満たされる必要がある。また、調製した試料において、転写反応を効率よく行うためには、鋳型 DNA と RNA ポリメラーゼの量比など細かい条件を最適値に設定する必要もある。インビトロ転写反応を行うために調製した試料
15 が、条件を満たしているか否かは、反応を実際に行い、その結果を解析して目的とする反応物が生成されているか否かを確認することによりはじめて知ることができる。実際、反応が進行しているか否かは、反応溶液を一定時間毎に採取し、RNA を抽出後、260 nm での吸収値を測定することで、反応液中の合成 RNA
20 A 量が増加していることを確認することが通常である。さらに、合成された RNA が完全長のものであることを確認するためには、RNA を抽出した後に電気泳動法により確認することが通常である。これらの方法は、合成された RNA の抽出操作が必要であり、この処理手順は通常極めて繁雑であり、時間も要するものである。従って、インビトロ転写反応を効率よく正常に進行させるための条件を決定するためには、上記の手順を繰り返しおこなわなければならない、多大の時間
25 と労力を必要とするものである。

一方、一本鎖 DNA など核酸の検出方法として、当該核酸とハイブリダイズす

る 2 種類の蛍光標識プローブを用いる方法が知られている。これは、それぞれ異なる種類の蛍光色素で標識された 2 種類のプローブを核酸を含む溶液に加える。2 種類のプローブが同一の核酸に互いに隣接してハイブリダイズすると、蛍光色素間の距離が短くなるため蛍光色素間に共鳴エネルギー移動が生じ、その結果、
5 蛍光スペクトルが変化することを利用したものである (Cardullo, R.A. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 8790-8794, USP 4996143)。この方法を一本鎖 RNA の検出に適用するときには、RNA 上でプローブがハイブリダイズ可能な部位 (塩基配列) を実験によりあらかじめ検索する必要がある。一般に、
10 数十塩基以上の長さをもつ RNA は水溶液中で特定の立体構造 (2 次構造) をとっており、その結果、RNA 中のほとんどの部位は他の核酸とハイブリダイゼーションをおこさない (Chiang, M.-Y., Chan, H. et al., J. Biol. Chem. 266, 18162-18172, (1991))。RNA 上でプローブがハイブリダイズする部位を確実に求める手法は確立されておらず、一般には、当該 RNA の 2 次構造をコンピューター
15 シミュレーションし (Michael Zuker and Patrick Stiegler, Nucleic Acid Reserch, 9, 133-148, 1981)、その予測された構造においてプローブがハイブリダイズ可能な部位の候補をピックアップし、その塩基配列をもつプローブを製作し、各プローブと RNA とのハイブリダイズの有無を実験的に確認している。これらの操作は非常に繁雑で、かつ多大な時間を要する。また、これらの操作を繰り返して行っても、当該 RNA にハイブリダイズする部位が見い出されることが
20 保証されているわけではない。これらの要因により、100 塩基以上の長さをもつ RNA が当該方法により検出された例は報告されていない。

発明の開示

本発明は、上記の問題点を改善し、RNA の抽出操作や電気泳動操作を必要とせず
25 ずにオンタイムで、RNA 転写合成反応をモニターする方法を提供するものである。すなわち、RNA 転写合成反応の開始、進行、終了のモニターと、さらに

上記反応により合成される全RNA量の定量、完全長RNAの合成をモニターする方法を提供するものである。さらに、上記転写反応の反応速度（転写の回転の速さ）を測定すること、上記反応条件の最適化を可能とする方法を提供するものである。

5 さらに、その方法を使用したモニター装置を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1A 本発明のモニター方法で使用するプローブを示す図である。

10 図1B 本発明のモニター方法で観測される蛍光スペクトル変化を模式的に示す図である。

図2 本発明のRNA転写合成反応のモニター方法の概略を示す図である。

15 図3A 本発明のモニター方法で複数組のプローブを使用する態様を示す図であり、合成されるRNAの3'末端近辺と相補的な塩基配列をもつプローブ、合成されるRNAの中間部分と相補的な塩基配列をもつプローブ、または合成されるRNAの5'末端近辺と相補的な塩基配列をもつプローブがそれぞれRNA上にハイブリダイズする様子を模式的に示す図である。

図3B それぞれのプローブがハイブリダイズすることにより得られる蛍光スペクトルを模式的に示す図である。

図4 本発明に係るモニター装置の概略を示す図である。

20 図5 インビトロ転写RNA合成反応モニター装置の構成を示す図である。

図6 1組の蛍光標識プローブで、2波長モニタリングする場合の測定ユニットの構成を示す図である。

図7 2組の蛍光標識プローブで、3波長モニタリングする場合の測定ユニットの構成を示す図である。

25 図8 96穴プレートを用いたインビトロ転写RNA合成反応モニター装置の構成を示す図である。

図9 本発明に係るモニター方法により、インビトロ転写反応の経時変化にともない、蛍光スペクトルが変化することを示す図である。

図10A 本発明に係るモニター方法により、インビトロ転写反応の経時変化を蛍光スペクトルの経時変化として測定可能であることを示す図であり、合成RNAを抽出してOD260 値より求めた転写RNAの合成量の経時変化を示す図である。

図10B 本発明に係るモニター方法により、インビトロ転写反応の経時変化を蛍光スペクトルの経時変化として測定可能であることを示す図であり、蛍光スペクトル上の2つの波長での蛍光強度比 (I_a/I_d 、 I_d : 515nm の蛍光強度、 I_a : 670nm の蛍光強度) の経時変化を示す図である。図11、図14、図17の縦軸も同様。

図11 ハイブリダイズするRNA上の部位が異なる3組のプロープをRNA転写合成反応のモニタリングにそれぞれ用いたときの蛍光スペクトルの2つの波長での蛍光強度比 (I_a/I_d) の経時変化を示したものである。本方法によるRNA転写合成反応のモニタリングは、使用するプロープのRNA上でのハイブリダイズ部位には依存しないことを示す。

図12A 完全長の XELF 1- α の DNA を鋳型にして、3'末端近辺にハイブリダイズする XELF-3F プロープを転写反応液に添加して、蛍光スペクトルの経時変化を測定した結果を示す図である。縦軸 I/I_d は 515nm の蛍光強度 (I_d) で規格化された蛍光強度である。図12B、図13A、図13B、図15A、図15B、図18A、図18B、図18Cの縦軸も同様。

図12B 3'末端が欠失した XELF 1- α の DNA を鋳型にして、3'末端近辺にハイブリダイズする XELF-3F プロープを転写反応液に添加して蛍光スペクトルの経時変化を測定した結果を示す図である。

図13A 完全長の XELF 1- α の DNA を鋳型にして、5'末端近辺にハイブリダイズする XELF-1F プロープを転写反応液に添加して蛍光スペクトルの経時変化を

測定した結果を示す図である。

図 1 3 B 3'末端が欠失した XELF 1- α の DNA を鋳型にして、5'末端近辺にハイブリダイズする XELF-1F プローブを転写反応液に添加して蛍光スペクトルの経時変化を測定した結果を示す図である。

5 図 1 4 実施例 4 で作成した検量線を示す図である。

図 1 5 A 実施例 5 において得られた、完全な長さの鋳型 DNA を用いた場合の蛍光スペクトルの経時変化を示す図である。

図 1 5 B 実施例 5 において得られた、欠失した鋳型 DNA を用いた場合の蛍光スペクトルの経時変化を示す図である。

10 図 1 6 実施例 6 において、ポリメラーゼ添加量の減少に伴い RNA 生合成量は減少していることの確認を示す図である。

図 1 7 5'末端近辺にハイブリダイズする XELF-1F ドナープローブ、XELF-1F アクセプタープローブを鋳型 DNA に対し、モル比で 200、400、800 倍添加した条件で RNA 転写合成反応の経時変化を示す図である。

15 図 1 8 A XELF 1- α RNA と XELF-1F プローブまたは XELF-4F プローブを 1 : 1 で混合してハイブリダイズさせた場合の蛍光スペクトルの結果を示す図である。

図 1 8 B 転写反応液に XELF-1F プローブを添加して蛍光スペクトルの経時変化を測定した結果を示す図である。

20 図 1 8 C 転写反応液に XELF-4F プローブを添加して蛍光スペクトルの経時変化を測定した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

すなわち、本発明は、RNA 転写合成反応系中の、転写合成された RNA の塩基配列の一部に連続してハイブリダイズする塩基配列を有する 2 種類 1 組のオリゴヌクレオチドプローブであって、エネルギードナー蛍光分子でラベル化された

ドナープローブと、エネルギーアクセプター蛍光分子でラベル化されたアクセプタープローブとからなる前記プローブの蛍光を測定することにより、前記RNA転写合成反応の開始、終了及び完全長のRNAの合成をモニターする方法を提供するものである。

5 また本発明は、RNA転写合成反応系中の、転写合成されたRNAの塩基配列の一部に連続してハイブリダイズする塩基配列を有する2種類1組のオリゴヌクレオチドプローブであって、エネルギードナー蛍光分子でラベル化されたドナー
10 プローブと、エネルギーアクセプター蛍光分子でラベル化されたアクセプタープローブとからなる前記プローブの蛍光を測定することにより、前記RNA転写合成反応による前記RNA転写を定量する方法を提供するものである。

15 また、本発明は、RNA転写合成反応系中の、転写合成されたRNAの塩基配列の一部に連続してハイブリダイズする塩基配列を有する2種類1組のオリゴヌクレオチドプローブであって、エネルギードナー蛍光分子でラベル化されたドナー
20 プローブと、エネルギーアクセプター蛍光分子でラベル化されたアクセプタープローブとからなる、少なくとも2組以上の前記プローブの蛍光を測定することにより、前記RNA転写合成反応における転写の開始と完全長RNAを同時にモニターする方法を提供するものである。

25 さらに、本発明は、インビトロ転写RNA合成反応のモニター装置であって、RNA転写反応を行う合成反応装置と、反応装置からサンプル溶液を導入するサンプル導入手段と、前記サンプル溶液の濃度を調節する溶媒混合装置（測定試料調製装置）と、蛍光測定装置と、を備えることを特徴とする装置を提供するものである。

30 より詳しくは、本発明は、RNA転写反応の開始、進行、完全長のRNAの合成をモニターする方法、さらに上記反応により合成される全RNA量の定量、完全長RNAの合成をモニターする方法、さらに、上記転写反応の反応速度（転写の回転の速さ）を測定する方法、上記反応条件の最適化を可能とする方法、およ

びそのモニター方法を使用して転写反応で合成されるRNAをモニターし、かつ反応のための最適条件を迅速に決定する装置である。

本発明に係る方法の概要は、図1A、Bおよび図2に説明されている。すなわち、転写反応で合成されるRNAの塩基配列のうち少なくとも一部の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプローブを反応溶液に添加して合成途上のRNAとハイブリダイズさせ、そのハイブリッド体の蛍光スペクトルを測定することにより可能とするものである。ここで本発明に関わる方法に用いるプローブは、2種類の蛍光標識プローブを1組として使用するものである。一方のプローブはエネルギー移動ドナー蛍光色素でラベル化し、他方のプローブはエネルギー移動アクセプター蛍光色素でラベル化したものであり、それぞれが前記RNAの特定の部分に連続してハイブリダイズ可能な塩基配列を有する(図1A)。前記プローブ(2種類1組みのプローブ)が前記RNAとハイブリダイズして特定の空間配置をとると、前記ドナー色素とアクセプター色素の空間距離が約80オングストローム以内になるこの条件で、ドナー色素が光励起されると、アクセプター色素へのエネルギー移動がある確率でおこり、その結果としてアクセプター色素からの蛍光が観測される(図1B)(Cardullo, R.A. et al.(1988), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 8790-8794)。前記エネルギー移動は、ドナーとアクセプターとの距離依存的におこる相互作用であり、距離が80オングストローム以上離れると、実質的に生じないことが知られている。従って、前記RNAにハイブリダイズしない状態においては、前記のアクセプター色素からの蛍光は見られない。

すなわち、前記プローブがハイブリダイズしていないときには、ドナーの蛍光(蛍光強度 I_d とする)が強くアクセプターの蛍光(蛍光強度 I_a とする)は弱い。前記プローブがハイブリダイズしたときには、ドナーの蛍光は弱くなりアクセプターの蛍光が強くなる。したがって、ドナーの蛍光強度(I_d)とアクセプターの蛍光強度(I_a)の比率をとることにより、前記プローブがハイブリダイズする前記RNAの部分配列の存在の判別およびその存在量の定量をすること

とが可能である。

図2に模式的に示されるように、転写反応によりRNAを合成する反応系中に前記プローブを添加された条件下で、RNAポリメラーゼによりRNA合成が開始され、前記プローブとハイブリダイズ可能な部分配列が生成されると、前記プローブがハイブリダイズすることとなる。この結果、上で説明したように、ドナーの蛍光強度が減少し、アクセプターの蛍光強度が増加することとなる。

ここで使用するプローブにおいては、プローブをRNAにハイブリダイズさせる部位は、合成されるRNAの任意の一部を選択することが可能である。すなわち、図2においては、合成反応液中に多量のプローブが含まれているために、個々のRNA分子の合成の途上において、プローブと相補的な塩基配列をもつ部位が合成されるとすみやかにプローブがハイブリダイズする。したがって、図2に模式的に示された方法を使用すると、RNAが特定の立体構造を形成した後にプローブを加えたときにはハイブリダイズがおこらない部位に対応するプローブを使用しても、プローブをRNAにハイブリダイズさせることが可能である。

また、アクセプターの蛍光波長においてドナーの蛍光がほとんど観測されない条件を満足するドナー色素とアクセプター色素の組み合わせを選択することも可能であり、この条件においては、アクセプター色素からの蛍光強度を観測することにより、前記RNAの合成された部分配列の存在を判別し、定量することが可能となる。

なお、本発明に係るプローブは、連続してハイブリダイズする塩基配列を有するものとして説明されているが、これに限定されるものではない。本発明に係る2種類のプローブが互いにRNAの一部に隣接してハイブリダイズするように塩基配列を有する場合において、ハイブリダイズした際の蛍光スペクトルが有意の変化が生じる場合には、有効に使用可能である。本発明に使用する2種類のプローブがあまりに離れてハイブリダイズする場合には、前記蛍光エネルギー移動が起こる確率が小さくなり実質的に蛍光スペクトルに変化が観測されなくなる。

より具体的に説明すると、インビトロ転写RNA合成反応液中に、前記説明した2種類1組のプローブを加える。前記転写反応が起こり、RNAの合成が開始され、前記プローブとハイブリダイズ可能な部分が生成すると、前記一組みのプローブが隣接した位置に連続してハイブリダイズする。ハイブリダイズすると、
5 前記色素間でエネルギー移動がおこり、蛍光スペクトルが変化する。試料から観測される蛍光は、RNAにハイブリダイズしたプローブからの蛍光と反応液中にフリーの状態で存在しているプローブからの蛍光の混合物である。全プローブ中で、RNAとハイブリダイズしたプローブの比率が大きくなるほど、蛍光スペクトルの変化量は大きくなる。すなわち、合成されるRNA量が増加するにしたがって、スペクトル変化は大きくなる。ここで、蛍光スペクトルにおいて、例えば
10 ドナーの蛍光波長における蛍光強度 (I_d) とアクセプターの蛍光波長における蛍光強度 (I_a) の比 (I_a/I_d) をとることとすると、合成されるRNA量が増加するにつれて、 I_a/I_d 値は増加していく。

いま、合成されるRNAの5'末端近辺の塩基配列にハイブリダイズする塩基
15 配列を有するプローブを使用するとする(図3Aの(1)で示される部分)。このときには、蛍光スペクトル変化を測定することにより転写反応の開始をモニターすることができることとなる。比 (I_a/I_d) を時間に対してプロットしたとき、 I_a/I_d 値の増大の速さは転写反応の回転の速さをあらわす。すなわち、調製した試料および使用条件において、(1) 転写反応がおこるか否か、(2)
20 反応の回転の速さ(反応条件の適切さの度合い)を知ることができる。

また、合成されるRNAの中間部分の配列とハイブリダイズするプローブを使用したときには(図3Aの(2)で示される部分)、RNA合成反応の伸長をモニターすることができることとなる。さらに、合成RNAの3'末端近辺の配列にハイブリダイズするプローブを使用したときには(図3Aの(3)で示される
25 部分)、完全長のRNAの合成をモニターすることが可能である。転写反応は、開始されたとしても、不完全な鋳型DNAの混在など種々の原因により不完全な

長さのRNAが合成されることがある。従来法では、完全長のRNAが合成されているか否かは、生成物を電気泳動で分離し、長さの確認を行う必要がある。

3'末端近辺にハイブリダイズするプローブを用いて本発明を使用すれば、完全長のRNAであるか否かをオンタイムで確認することが可能である。

5 転写反応によりRNA合成を行うために調製した試料において、最適な反応条件を得るためには、例えば、次のような使用方法が可能である。まず、5'末端近辺にハイブリダイズするプローブを使用し、転写反応がおこるか否かを確認する。さらに、転写反応の速度をモニターし、反応速度が最も高くなる条件に設定する。次に、3'末端近辺にハイブリダイズするプローブを使用し、設定した条件において完全長のRNAが合成されることを確認する。

10 エネルギー移動をおこすドナー/アクセプターの蛍光色素の組み合わせは多種類存在するが、本発明に係る方法は色素の組み合わせには依存しないため、どのような色素の組み合わせを用いても使用可能である。したがって、2組以上の蛍光色素の組み合わせを同時に使用することも可能である(図3B)。たとえば、

15 5'末端近辺にハイブリダイズするプローブをある特定種類のドナー/アクセプター蛍光色素で標識し、3'末端近辺にハイブリダイズするプローブを他の種類のドナー/アクセプター色素で標識する。これらを同時に反応液中に添加することにより、転写反応の開始の有無と完全長のRNAの合成の確認を同時に行うことも可能である。

20 本方法では、反応液中に加えるプローブの量は、任意に設定することが可能である。すなわち、鋳型DNA量に対して、10倍量加えることも、1000倍量加えることも可能である(モル比)。10倍量加えたときには、合成されるRNA量が鋳型DNAの10倍量までの範囲において、蛍光スペクトルが変化する。RNAがそれ以上合成されても、蛍光スペクトルは変化しない(プローブがすべて合成されたRNAにハイブリダイズし、反応液中にフリーのプローブが存在しないために、新しく合成されたRNAにはハイブリダイズするプローブが存在し

25

ない)。したがって、鋳型DNAに対して、小過剰にプローブを添加して反応をおこさせたときには、転写反応の初期段階を精度よくモニターすることができる。これは、5'末端近辺にハイブリダイズするプローブを使用し、転写反応の有無や速度を知ることにより適している。一方、1000倍量加えたときには、合成されるRNAが鋳型DNAの1000倍量までの範囲内において、蛍光スペクトルが変化する。例えば、合成反応が鋳型DNA量の1000倍量以下のRNAを合成したところで事実上終了したのであれば、蛍光スペクトルの経時変化はその時点でおこらなくなる。したがって、合成反応の終了をモニターすることに適している。他方、このように、鋳型DNAに対して大過剰にプローブを添加して反応をおこさせたときには、反応の初期段階（RNA合成量が少量のとき）に、蛍光スペクトル変化が小さく、精度よく測定することはむずかしい。すなわち、転写反応がおこるか否かなど反応の初期段階をモニターするときには、鋳型DNAに対して小過剰にプローブを加え、反応の終了の有無など後期段階をモニターすることを目的とするときには、鋳型DNAに対して大過剰にプローブを加えればよい。

（プローブの構造）

本発明に関わるプローブの塩基配列は、合成されるRNAの任意の一部の部位と実質的に相補的な塩基配列をもつものであれば、特に制限はない。すなわち、当該プローブと合成された当該RNAがハイブリダイズするか否かをあらかじめ実験により確認しておく必要はない。もちろん、合成されたRNAとハイブリダイズする塩基配列を実験的に検索し、その塩基配列をもつプローブを使用してもよい。また、塩基の長さについても、当該プローブが当該RNAに実質的に特異的にハイブリダイズする要件を満たしていれば特に制限はない。この長さは通常15塩基以上である。

本発明に係わるプローブの蛍光色素の種類、すなわち、ドナー蛍光色素およびアクセプター蛍光色素の組み合わせの種類としては特に限定されないが、エネルギー移動の臨界移動距離（エネルギー移動効率が50%となる距離）が大きい組

み合わせが、エネルギー移動にともなう蛍光スペクトルの変化が大きいため好ましい。たとえば、フルオロセイン系の色素をドナーとし、ローダミン系の色素をアクセプターとする組み合わせが好適に使用可能である。例えばエネルギードナー蛍光分子としては、B O D I P Y系（4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene モレキュラープローブス社）、フルオレセイン系、ローダミン系の蛍光色素が好適に使用可能であり、特に本発明においてはB O D I P Y、フルオレセインが好ましい。エネルギーアクセプター蛍光分子としては、インドシアニン系、ローダミン系色素が好適に使用可能であり、特に本発明においてはC y 5, C y 3, C y 3. 5 (Amersham LIFE SCIENCE、FluoroLink、Cat.No.PA25001, PA23001, PA23501)及びローダミンが好ましい。

さらに、本発明においては、上記蛍光色素をプローブと結合する結合基については特に限定されないが、上記2種類の蛍光色素が望ましい蛍光エネルギー移動がおこるように適当なリンカーであって、プローブが充分水溶性を維持する種類のものを介して結合することが可能である。たとえば、テトラメチレン鎖-デカメチレン鎖が使用可能である。

さらに、本発明においては、プローブとしてオリゴヌクレオチドとしてDNAを用いて説明されているが、特にDNAに制限されない。種々のヌクレオチド誘導体も使用可能であり、RNA上の特定の塩基配列部に実質的に特異的にハイブリダイズ可能であればよい。具体的には、RNA、ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド（S-オリゴ）、メチルホスホネート型オリゴヌクレオチド（M-オリゴ）、ホスホロアミデート型オリゴヌクレオチド（A-オリゴ）、ペプチド核酸が挙げられる。

（プローブの合成方法）

上記説明した本発明に係る検出用プローブのオリゴヌクレオチド配列部を調製する方法においては特に制限はない。公知の核酸合成方法が好ましく使用可能である。特に種々の固相合成方法に基づく自動合成方法が好ましく、例えばアミダ

イト、トリエステル等の合成法が好ましく用いられる (Edited by F.Eckstein, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotides synthesis, Oligonucleotide and Analogues, IPL Press, 1991)。

さらに、プローブ中に蛍光色素を結合するための好ましいリンカー部を導入する
5 方法は種々のポリペプチド修飾用試薬を用いることで可能である。本発明にお
いては、特に 5' 末端アミノ化用試薬である 6- (トリフルオロアセチルアミ
ノ) ヘキシル- (2-シアノエチル)- (N, N-ジイソプロピル)-ホスホロ
アミダイトを、上記化学合成時に同時に使用できる。これによりオリゴヌクレオ
チド鎖の任意の位置にヘキシルアミノ基 (トリフルオロアセチル基を除いた後)
10 を導入可能となる。また、リンカー部の位置およびリンカー部の長さの選択によ
り、2種類の蛍光色素が好ましい相対的空間配置をとりうるプローブを調製する
ために、その空間配置を推定するための種々の分子モデルや、分子モデルコンピ
ュータプログラム等が使用可能である。リンカー部と必要な蛍光色素の結合方法、
または該リンカー部をオリゴヌクレオチドプローブの適当な位置の塩基に結合す
15 る方法については、特に制限はなく、化学合成方法により、または酵素による方
法等が使用可能である。

(蛍光測定装置)

本発明で使用され得る蛍光測定手段については特に制限はない。通常の蛍光測
定装置であり、エネルギードナー蛍光色素を励起する励起光が発生し、また、エ
20 ネルギードナー、およびアクセプター蛍光色素の蛍光が測定可能であれば好まし
く使用できる。

(データ処理)

蛍光測定手段で得られたデータの処理については、使用される色素の種類によ
り最適の処理方法が応用可能であり、特に制限されない。

25 エネルギードナー色素の蛍光スペクトルが、エネルギーアクセプター色素の観
測蛍光波長とほとんど重ならないように選択された場合には、エネルギーアクセ

プター色素の観測蛍光波長での蛍光強度の時間変化をそのまま使用することが可能となる。すなわち、アクセプターの観測蛍光波長におけるエネルギードナー色素からの蛍光の時間変化による影響は無視できる程度となる。

(インビトロ転写RNA合成モニター装置)

5 図4には、本発明に係わる方法を使用したインビトロ転写RNA合成モニター装置の1態様を示す。サンプル導入手段3は、種々の型、サイズのインビトロ転写RNA合成反応装置2から適当なサンプリングライン10により前記反応溶液の一部を測定溶液調製装置5に導入する手段である。この際、サンプル導入手段3は制御装置7により、サンプリングの時期、溶液量を制御され得る。また制御
10 装置7により、溶媒装置11から適当な量の溶媒が溶媒混合ライン12を通じて測定溶液調製装置5に加えられる。測定溶液調製装置5の希釈されたサンプルは、蛍光測定装置6へ導入される。

また、合成されたRNAとハイブリダイズすることがあらかじめ実験的に確認されているプローブを使用する場合には、以下の形態の合成モニター装置も可能
15 である。測定溶液調製装置5にプローブキットを導入するプローブ調製装置を付け加えてもよい。

すなわち、制御装置7により設定された必要な種類および濃度のプローブキットがプローブ調製装置よりプローブ混合ラインを通じて混合して測定溶液調製装置5へ導入してもよい。前記測定溶液調製装置5は、制御装置7により、前記サンプル溶液中の合成RNAとプローブのハイブリダイズ条件を設定してもよい。具
20 体的には、必要な容積の混合セル、濃度および時間である。さらに必要ならば、制御装置7により時間および攪はん速度を設定されたサンプルとプローブの混合溶液を攪はんする装置があってもよい。プローブ調製装置は、モニター目的に適したプローブの種類を選択し、適当な濃度に希釈してプローブ溶液を調製して、
25 前記測定溶液調製装置5に導入するものである。この際、圧力またはペリスタポンプ等により導入可能である。測定溶液調製装置5でハイブリダイズさせた後、

蛍光測定装置 6 へ導入される。ここで蛍光測定装置 6 は、制御装置 7 により設定された励起光条件等の蛍光測定の条件に従い、蛍光スペクトル測定し、得られたデータをデータ処理装置 8 へ送る。測定データは、特定の励起波長により励起された場合の蛍光スペクトルおよびその時間変化のデータからなるものである。データのデータ処理装置 8 への取込み手段はデータ処理装置 8 内の記憶装置へ記憶することも可能である。データ処理装置 8 へ取り込まれたデータに基づき、インビトロ転写 RNA 合成反応における転写の開始と完全長 RNA の合成の確認、又は転写 RNA の濃度変化を算出するプログラムにより行われる。転写 RNA の濃度変化を算出する手段は、あらかじめ前記記憶装置に記憶した各エネルギーアクセプタープローブの特定波長での蛍光強度とハイブリダイズした RNA の濃度（または分子の数）との検量線に基づき算出することも可能である。なお、上記説明した手段は、データ処理装置 8 により設けられた記憶装置（図示せず）にあらかじめ記憶されているプログラムに従って、自動的に行うことも可能である。係るプログラムは入出力装置 9 により前記記憶装置に入力することも可能であるが、あらかじめ記憶されたプログラムを、入出力装置 9 から選択することにより読み込ませることも可能である。すなわち、あらかじめプログラムされた時間、または入力装置から入力することにより、サンプリングラインを開き、反応中の溶液の一部がモニター系に導入され、ついで、前記制御装置によりあらかじめ用意されているプローブ溶液を選択し、プローブ混合装置に導入され、混合されたサンプル溶液とプローブがハイブリダイズ条件に保持され（ハイブリダイズ条件は、あらかじめ記憶されているパラメータを、前記制御装置内の記憶装置から読取り前記制御装置により設定される）、ついで、ハイブリダイズ終了後、所定の時間に蛍光スペクトル測定のために、蛍光スペクトル測定装置に送られ、プローブに応じて設定されたエネルギードナー蛍光色素励起波長により照射し、かつプローブに応じて設定されたエネルギーアクセプター蛍光色素のそれぞれの蛍光波長での蛍光強度を測定し、測定データを前記制御装置内の記憶装置に記憶させる。

前記記憶された測定データは、データ処理装置により読みだされ各プローブのハイブリダイズの有無を判別し、結果を出力する。測定後、サンプル溶液はドレイン 14 へ排出される。

より詳しいインビトロ転写 RNA 合成反応モニター装置の 1 形態を図 5 に示す。図 5 に示されるように、装置は、反応ユニット、測定試料調製ユニット、測定ユニット、コントロールユニット、演算ユニットおよびモニターより構成される。反応ユニットは、RNA 転写合成反応を行うユニットであり、反应用キュベットと反応キュベット中の反応液を一定温度に保つ温度制御装置とから成る。反応キュベットには、鋳型 DNA、プローブ、RNA ポリメラーゼ、ヌクレオチド 3 リン酸 (ATP、GTP、CTP、UTP)、反応緩衝液が加えられる。これらの反応液に RNA ポリメラーゼまたは鋳型 DNA を添加することで反応をスタートさせる (時間 = 0 とする)。反応キュベット中の反応液は、温度制御装置により一定温度 (例えば 37°C) に保たれる。温度制御装置としては、ウォーターバス、ホットプレートなどが使用可能である。反応スタート後、あらかじめ設定された時間毎に、反応液の一部を採取し、測定試料調製ユニットの測定用キュベットへ移す。測定用キュベットにはあらかじめ一定量の緩衝液が分注されている。または、サンプリングした試料を希釈用キュベットに移し、これに希釈液のリザーバーから一定量の希釈液を加えて希釈した後に、測定用キュベットに移してもよい。サンプリングは手動で行うことも可能であるし、自動化してもよい。測定試料調製用ユニットは、測定用セルが円形状に多数並んだものである。個々の測定用セルは、1 箇所の「サンプル入力ポジション」、1 箇所の「測定ポジション」、多数の「待機ポジション」のいずれかに位置している。サンプリングされた試料は「サンプル入力ポジション」に位置する測定用キュベットに注入される。その後、キュベットは「測定ポジション」へ移動する。「測定ポジション」に移動したキュベットは、測定試料調製ユニットの下部に位置する測定ユニットへ移動する。測定ユニットでは蛍光測定が行われる。測定終了後、キュベットは測定

試料調製ユニットの元の位置に戻る。これで1サイクルが完了する。次に、再び反応液からサンプリングされた試料が「サンプル入力ポジション」の位置の測定用キュベットに注入されると、次のサイクルが開始される。測定試料調製ユニットの測定用セルの並びかたは円形状に限定されるものではない。測定ユニットではキュベット中の試料の蛍光測定が行われる。図6および図7に示されるように、励起光用の光源（ランプなど）、光源からの光を波長分別するフィルターまたは分光器、測定用セル、測定用セル中の試料から発せられる蛍光を波長分別するフィルターおよび光検出器（フォトマルなど）から成る。測定用セルは前記測定試料調製ユニットから測定ユニットの測定用セルの位置に移動してくる。試料から発せられる蛍光は、2方向または3方向で同時に検出する。それぞれの方向では、波長特性がそれぞれ異なるフィルターを通して蛍光強度の測定を行う。2方向で測定するとき（図6）には、フィルター1はドナーの蛍光、フィルター2はアクセプターの蛍光をそれぞれ選択的に透過させる波長域に対応するものである。2組以上の蛍光標識プローブを使用して転写反応の開始と完全長RNAの合成を同時モニタリングするときは、試料からの蛍光を3方向で同時に検出する。このとき（図7）には、フィルター1はドナーの蛍光、フィルター2は2種類のアクセプターのうち1種類のアクセプターの蛍光、フィルター3は他の種類のアクセプターの蛍光をそれぞれ選択的に透過させる波長域に対応するものである。光検出器で測定された蛍光強度（EM1、EM2、EM2）は、それぞれ演算ユニットに送られ、蛍光強度比（ $EM2/EM1$ 、 $EM3/EM1$ ）が計算される。これらの結果はモニターに送られてモニター上に表示される。上記のすべてのプロセスはコントロールユニットで制御される。

さらに、別の態様として、図8に、本発明に係わる方法を使用したマイクロプレートリーダー型インビトロ転写RNA合成モニター装置の一態様をしめす。

インキュベーション台は、96穴プレートを固定するものであり、かつインキュベーション機能を有しており、温度調節はコントローラーによって制御され得

る。プレート及びインキュベーション台は、プレート固定後、コントローラーの制御によって自動でスライドし、測定位置に移動される。

励起および蛍光フィルターユニット内には数種類の励起および蛍光（検出用）フィルターを内蔵することが可能であり、フィルターを光軸上に自動セットするための装置も内蔵可能である。コントローラーを介して励起及び蛍光フィルターが選択されると、フィルターは光軸上のホルダーに自動セットされる。このとき、複数の励起、検出波長に対応できるようにフィルターホルダーは多連用のものを用いることも可能である。これらのホルダーは、コントローラーの制御によって光軸上をスライド可変することが可能である。

ファイバー可変ユニットは、コントローラーから測定開始の信号が入ると、励起光及び蛍光（検出光）ファイバーを 96 穴内の指定された位置に移動させる。このとき、ファイバーが移動する位置はコントローラーによって制御される。通常は、開始位置と終了位置をコントローラーで入力すると、ファイバーが 96 穴上を移動して、連続的に試料を分析することが可能である。

上記過程を経て、励起光がプレート上の 1 つの試料（穴）を照射すると、蛍光は再びファイバー内を通過して蛍光用フィルターユニット内に入り、特定の波長のみの蛍光（フィルターセットした波長）が取り出される。

その後、選別された光は、検出ユニット内に入り、ドナーとアクセプターの蛍光強度を測定する。ここまでの一連の過程はコントローラーで入力した時間毎に行う。得られた蛍光強度はデータ処理装置にて蛍光強度比に変換され、時間に対してプロットすれば、転写反応を自動でモニタリングすることが可能である。

以下本発明の実施例を説明する。

（実施例）

本実施例においては転写反応の鋳型 DNA としてはすべて XELF 1- α DNA を使用し、XELF 1- α RNA の合成反応をモニタリングした。試薬は全て Ambion 社製、MEGAscript T3 キットを使用した。

鋳型DNA及び試薬

本実施例で使用した鋳型DNA、XELF1- α は以下の様に調製した。

インビトロ転写反応用キット (Ambion 社、MEGAscript T3 kit) 内のコントロール DNApTRI-Xef1 を制限酵素 EcoR I で処理し、約 1.8kb の XELF1- α DNA を取り出した。この DNA 断片を pBluescript II (STRATAGENE 社製、TOYOBO 社より入手) にクローニングし、pBlue-XELF1- α の DNA を得た (約 4.76kb)。インビトロ転写反応には、pBlue-XELF1- α の DNA を制限酵素 SmaI で処理して直鎖状の DNA としたものを使用した。また、インビトロ転写反応に使用した NTP、10xTranscription buffer、T3 RNA ポリメラーゼは、Ambion 社、MEGAscript T3 kit の試薬を使用した。

プローブ合成

(a) RNA の 5' 末端近辺の塩基配列と相補的な塩基配列をもつプローブ：XELF-1 F ドナープローブ、5' -BODIPY493/503-AGCCTTTTCCCATCTC-3' は、XELF1- α の塩基配列番号 (GeneBank Accession No. M25504)、184-199 の塩基配列と相補的であり、かつ BODIPY493/503 色素を 5' 末端の A で結合したものである。

XELF-1 F アクセプタープローブ、5' -AGGCATACTTG (Cy5) AAGG-3' は、XELF1- α の塩基配列番号、200-214 の塩基配列と相補的であり、かつ Cy5 色素を上記の位置 (G と A の間) で結合したものである。

(b) RNA の中間部分の塩基配列と相補的な塩基配列をもつプローブ：XELF-2 F ドナープローブ、5' -BODIPY493/503-TCTTGATGTATGTGC-3' は XELF1- α の塩基配列番号、566-580 の塩基配列と相補的であり、かつ BODIPY493/503 色素を 5' 末端の T で結合したものである。

XELF-2 F アクセプタープローブ、5' -GGTTGTAACCA (Cy5) ATCT-3' は XELF1- α の塩基配列番号、581-595 の塩基配列と相補的でありかつ Cy5 色素を上記の位置 (A と A の間) で結合したものである。

(c)RNAの3'末端近辺の塩基配列と相補的な塩基配列をもつプローブ：XELF-3F ドナープローブ、5'-BODIPY493/503-TTAAACTCTGATGGCC-3'はXELF 1- α の塩基配列番号、1504-1519の塩基配列と相補的であり、かつBODIPY493/503色素を5'末端のTで結合したものである。

5 XELF-3F アクセプタープローブ、5'-ACCCAGTCTTTT (Cy5) ACTA-3'はXELF 1- α の塩基配列番号、1520-1534の塩基配列と相補的であり、かつCy5色素を上記の位置(TとAの間)で結合したものである。

10 (d) RNA とハイブリダイズしにくいと予想されるプローブ：XELF-4F ドナープローブ、5'-BODIPY493/503-AGTACCAGTGATCAT-3'はXELF 1- α の塩基配列番号、346-360の塩基配列と相補的であり、かつBODIPY493/503色素を5'末端のAで結合したものである。

XELF-4F アクセプタープローブ、5'-ACAGTCAGCCT (Cy5) GAGA-3'はXELF 1- α の塩基配列番号、361-375の塩基配列と相補的であり、かつCy5色素を上記の位置(TとGの間)で結合したものである。

15 (e) C-FOS ドナープローブ / C-FOS アクセプタープローブ：C-FOS ドナープローブ、5'-BODIPY493/503-TCTAGTTGGTCTGTC-3'はc-fos RNAの塩基配列番号、662-676と相補的であり、かつBODIPY493/503色素を5'末端のAで結合したものである。

20 C-FOS アクセプタープローブ、5'-GCAGACTTCTC (Cy5) ATCT-3'はc-fosの塩基配列番号、677-691と相補的であり、かつCy5色素を上記の位置(CとAの間)で結合したものである。

(f)XELF-5F プローブ：XELF-5F アクセプタープローブ、5'-ACCCAGGCATACTTG (Cy5) -3'はXELF 1- α RNAの塩基配列番号、204-218の塩基配列と相補的であり、かつCy5色素を3'末端のGで結合したものである。

25 上記プローブの合成には自動合成機は、Perkin Elmer社のModel 394、またはPerseptive社のExpedite Model 8

909を使用して、 β シアノエチルアミダイト法に従い行った。得られた粗生成物をDEAE-HPLCで分析し、主成分を分取した。保持時間は20～30分であった。さらに、分取液を脱塩の後、凍結乾燥した。

DEAE-HPLC (陰イオン交換) 条件:

5 溶媒A: 0.2M HCOONH_4 20% CH_3CN

溶媒B: 1.0M HCOONH_4 20% CH_3CN

カラム: TSK-gel DEAE-2WS 4.6×250mm (東ソー (株) 社製)

流量: 0.8ml/min

10 温度: 40°C

Bグラジエント: 35%–85% (20min)

Cy5色素蛍光ラベル化反応

15 プローブの5'末端修飾用、またはプローブの中間の位置での使用として、それぞれ、6-(トリフルオロアセチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホロアミダイト (TFACヘキサノールアミンリンカー、パーキンエルマー・ジャパン社製, Cat No.400808)、およびUni-Link Amino Modifier (CLONTECH Laboratories, Inc 製、Code No.CL5190-1, 以下同じ) を上記自動合成機と共に使用した。

20 上で得られた乾固したオリゴヌクレオチドを0.5M NaHCO_3 /NaHCO₃緩衝液 (pH9.0) 200 μ lに溶解し、Cy色素を100 μ l (1チューブ) の滅菌水に溶解し両者を混合し、遮光して一晩反応した。反応液をゲル濾過し、未反応の色素を除去した。RP-HPLC (Bグラジエント15～65% (20分)) で分析し、20～25分付近のピークの成分を分取した。分光光度計で260nmに吸収があること及び蛍光色素の吸収があることを確認した。

25 RP-HPLC (逆相C18) 条件:

溶媒A: 0.05M TEAA 5% CH_3CN

溶媒B : 0.05M TEAA 40% CH₃CN

カラム : CAPCELL PAKC18 6×250mm (資生堂(株)社製)

流量 : 1.0ml/min

温度 : 40℃

5 BODIPY 493/503 色素蛍光ラベル化反応

10 プローブの5'末端修飾用、またはプローブの中間の位置での使用として、それぞれ、6-(トリフルオロアセチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホロアミダイト(TFAcヘキサノールアミンリンカー)、およびUni-Link AminoModifierを上記自動合成機と共に使用した。NHSS 2.5mgを30μl、EDAC 5mgを50μlの滅菌水に溶解した。これに、BODIPYプロピオン酸1mgを50μl DMFに溶解したものを混合し、室温で30分反応させた。得られた溶液を、乾固したオリゴヌクレオチドを0.5M NaHCO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.0) 300μlに溶解したものと混合し、遮光して一晩反応した。反応液をゲル濾過し、未反応の色素を除去した。

15 RP-HPLC (FITC、Bグラジエント30~80%(20分))で分析し、25~35分付近のピークを分取した。分光光度計で260nmに吸収があること及び蛍光色素の吸収があることを確認した。これらは凍結乾燥して保存した。

20 転写反応

本発明においてモニターするインビトロ転写反応の反応条件については特に制限はなく、使用するインビトロ転写反応に応じて変更可能である。

25 蛍光スペクトル測定

日立製、F4500 形分光蛍光光度計を使用した。480nmで励起し、500nmから

750nm の範囲で蛍光スペクトル測定を行い、ドナーに対するアクセプターの蛍光強度の比を求め、相対蛍光強度 (I_a/I_d) とした。

(実施例 1)

5 蛍光スペクトル変化と合成RNA量との相関

本発明の方法において、インビトロ転写RNA合成反応によりRNAが合成されるにともない蛍光スペクトルの変化が変化していくことを確認するために以下の実験を行った。以下の組成の転写反応液 150 μ l に2種類1組の蛍光標識プローブを加えてRNA転写合成反応を行った。プローブは、RNAの5'末端近
10 辺と相補的な塩基配列をもつ2種類1組のプローブ (XELF-1Fドナープローブ/XELF-1Fアクセプタープローブ) を使用した。鋳型DNAを加えることにより反応をスタートさせた。反応は37°Cで行った。

<転写反応液組成>

| | | |
|----|--|------------|
| | ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| 15 | XELF1- α DNA | 6pmol |
| | 10 \times Transcription buffer | 15 μ l |
| | XELF-1F (ドナープローブ) | 2578pmol |
| | XELF-1F (アクセプタープローブ) | 2577pmol |
| | T3 RNA ポリメラーゼ | 15 μ l |
| 20 | ジエチルピロカーボネート (DEPEC) 処理水で 150 μ l にした。 | |

一定時間毎に5 μ l ずつ反応液を分取し、20mM EDTA を含む 1XSSC を 145 μ l 添加した後、蛍光スペクトル測定を行った。蛍光スペクトルは、520nm付近にドナープローブの Bodipy493/503 に基づく蛍光が観測され、670nm付近
25 にアクセプタープローブの Cy 5 に基づく蛍光が観察された。反応時間の経過に従って Bodipy493/503 に基づく蛍光が減少し、Cy 5 に基づく蛍光は増大した

(図9)。コントロール実験として、XELF-1Fドナープローブ/XELF-1Fアクセプタープローブの代わりにXELF1- α RNAと相補的な塩基配列をもたない2種類1組のプローブ(C-FOSドナープローブ/C-FOSアクセプタープローブ)を使用したときには、蛍光スペクトルに変化は観察されなかった。すなわち、観察される蛍光スペクトル変化は、転写反応液に添加されているプローブが合成RNAの特定の部位に特異的にハイブリダイズすることにより生じたものである。520nmの蛍光強度(I_d)と670nmの蛍光強度(I_a)の比(I_a/I_d)を反応時間に対してプロットしたものが図10Bである。

また、このときの合成RNA量を以下の手順により求めた。前記反応液中から一定時間毎に5 μ lずつ反応液を分取し、145 μ lの反応停止液(15 μ lの5M NH_4OAc および100mM EDTAと130 μ lのジエチルピロカーボネート(DEPEC)処理水の混合液)を添加して、反応を停止させた。その後、フェノール・クロロホルム抽出およびクロロホルム抽出を行い、イソプロピルアルコール沈殿にてRNAを回収した。回収したRNA沈殿物は、20 μ lのDEPEC処理水に溶解した後、260nmの吸光度によりRNA量を求めた。RNA量を反応時間に対してプロットしたものが図10Aである。

図10Aと図10Bの比較から、蛍光スペクトル変化とRNA合成量の変化はよい相関を示していることがわかる。

(実施例2)

ハイブリダイズするRNA上の部位が異なる3組のプローブによる転写反応のモニタリング

本方法によるRNA転写合成反応のモニタリングは、使用するプローブのRNA上でのハイブリダイゼーション部位には依存しない。

実施例1では、プローブとして、RNAの5'末端近辺(184-214)と相補的

な塩基配列をもつオリゴヌクレオチド (XELF-1Fプローブ) を使用した。
RNA上の他の部位と相補的な塩基配列をもつオリゴヌクレオチドをプローブと
して使用したときにも、同様にRNA転写合成反応のモニタリングが可能である
ことを確認するために、RNAの中間領域 (566-595) と相補的な塩基配列をも
5 つXELF-2Fプローブ、RNAの3'末端近辺 (1504-1534) と相補的な塩
基配列をもつXELF-3Fプローブ、を作製した。

XELF-1Fプローブ、XELF-2Fプローブ、XELF-3Fプローブの
3組のプローブをそれぞれ転写反応液に添加した3組の試料を調製し、RNA転
写合成反応を行った。

10 <転写反応液の組成>

試料1 : XELF-1Fプローブ

| | |
|----------------------------------|-----------|
| ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| XELF1- α DNA | 0.8pmol |
| 10 \times Transcription buffer | 5 μ l |
| 15 XELF-1F ドナープローブ | 430pmol |
| XELF-1F アクセプタープローブ | 430pmol |
| T3 RNA ポリメラーゼ | 5 μ l |
| DEPEC 処理水で 50 μ l にした。 | |

試料2 : XELF-2Fプローブ

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 20 ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| XELF1- α DNA | 0.8pmol |
| 10 \times Transcription buffer | 5 μ l |
| XELF-2F ドナープローブ | 430pmol |
| XELF-2F アクセプタープローブ | 430pmol |
| 25 T3 RNA ポリメラーゼ | 5 μ l |
| DEPEC 処理水で 50 μ l にした。 | |

試料 3 : X E L F - 3 F プローブ

| | | |
|---|----------------------------------|-----------|
| | ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| | XELF1- α DNA | 0.8pmol |
| | 10 \times Transcription buffer | 5 μ l |
| 5 | XELF-3F ドナープローブ | 430pmol |
| | XELF-3F アクセプタープローブ | 430pmol |
| | T3 RNA ポリメラーゼ | 5 μ l |
| | DEPEC 処理水で 50 μ l にした。 | |

10 図 11 は、それぞれの試料について、蛍光スペクトルの 2 つの波長での蛍光強度比 (I_a/I_d) を反応時間に対してプロットしたものである。3 つの試料の蛍光スペクトルの経時変化は同様の特性を示しており、本方法による RNA 転写合成反応のモニタリングは、使用するプローブの RNA 上でのハイブリダイゼーション部位に依存しないことを示している。

(実施例 3)

インビトロ転写反応の完全長 RNA 生合成のモニタリング

20 XELF 1- α の 3' 末端が欠失した鋳型 DNA と完全長の鋳型 DNA による転写反応を 3' 末端近辺と 5' 末端近辺に相補的な塩基配列をもつプローブでそれぞれモニタリングして、蛍光スペクトルの経時変化を観察した。

<転写反応液の組成>

| | | |
|----|----------------------------------|-----------|
| | ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| | 10 \times Transcription buffer | 7 μ l |
| | XELF-3F ドナープローブ | 608pmol |
| 25 | XELF-3F アクセプタープローブ | 608pmol |
| | T3 RNA ポリメラーゼ | 7 μ l |

上記反応液に 3'末端が 1020 塩基欠失した XELF 1- α の鋳型 DNA、あるいは完全長の XELF 1- α の鋳型 DNA をそれぞれ 3.5 μ g 添加した後、DEPEC 処理水で全量を 70 μ l にし、37 $^{\circ}$ C で反応させた。

5 図 12A、B は 3'末端が欠失した XELF 1- α と完全長の XELF 1- α の 2 種類の DNA をそれぞれ鋳型にして、3'末端近辺にハイブリダイズする XELF-3F ドナープロブ、XELF-3F アクセプタープロブを添加して蛍光スペクトルの経時変化を測定した結果である。

10 欠失した DNA を鋳型として 3'末端近辺にハイブリダイズする XELF-3F ドナープロブ、XELF-3F アクセプタープロブで蛍光スペクトルの経時変化を測定した場合、蛍光スペクトルの変化が観察されない (図 12B) のに対し、完全長の DNA を鋳型とした場合には蛍光スペクトルの経時変化が観察された (図 12A)。

15 一方、図 13A、B は 5'末端近辺にハイブリダイズする XELF-1F ドナープロブ、XELF-1F アクセプタープロブを使用して蛍光スペクトルの経時変化を測定した結果である。欠失、完全長いずれの鋳型でも蛍光スペクトルの経時変化が観察された。

20 生合成された RNA の長さを確認するためにそれぞれ反応後の転写反応液 20 μ l に 2U/ μ l の DNase I を 1 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 30min 反応させた。その後、フェノール・クロロホルム抽出及びクロロホルム抽出を行い、イソプロピルアルコール沈殿にて生合成された RNA を回収した。回収した RNA 沈殿物は、20 μ l の DEPEC 処理水に溶解し、アガロースゲル電気泳動にて RNA のサイズを確認した。完全長の鋳型を用いた場合には完全な長さ (約 1.9kb) の RNA が合成され、欠失した鋳型 DNA の場合では約 1 kb 欠失した RNA が合成されていた。

25 以上の結果より、完全長 (目的の長さを有する) RNA の生合成をモニタリングするためには、生合成される RNA の 3'末端近辺に相補的なプロブを転写反応液に添加し、蛍光スペクトルの経時変化を観察すればよい。

(実施例 4)

インビトロ転写モニタリングによる RNA 生合成の定量

5 蛍光スペクトルから求めたドナーの蛍光強度 (I_d) に対するアクセプターの蛍光強度 (I_a) の比 (I_a/I_d) に対し、生合成された RNA 濃度をプロットした検量線を作成することにより、RNA 量 (濃度) を知ることが可能である。

(検量線の作成)

10 下記の転写反応液に XELF 1- α の鋳型 DNA $2.5\mu\text{g}$ 、XELF-1 F プローブを鋳型 DNA に対しモル比で 1000 倍量添加し、DEPEC 処理水で全量を $50\mu\text{l}$ にした後 37°C で反応させた。この転写反応液より一定時間毎に蛍光スペクトル測定と RNA 抽出のためにそれぞれ $2.5\mu\text{l}$ ずつ反応液を採取した。

<転写反応液の組成>

| | |
|----------------------------|----------------|
| ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| XELF1- α DNA | 0.8pmol |
| 15 10×Transcription buffer | $5\mu\text{l}$ |
| XELF-1F ドナープローブ | 820pmol |
| XELF-1F アクセプタープローブ | 820pmol |
| T3 RNA ポリメラーゼ | $5\mu\text{l}$ |

DEPEC 処理水で $50\mu\text{l}$ にした。

20 蛍光スペクトル測定は、 $147.5\mu\text{l}$ の 20mM EDTA を含む $1\times\text{SSC}$ で希釈した後、蛍光スペクトル測定を行った。生合成された RNA 量は一定時間毎に分取した転写溶液から実施例 1 と同様な方法で RNA 抽出を行い、260nm の吸光度値より算出した。また、吸光度 260nm による定量では、反応液中に存在する未反応のリボヌクレオチドや鋳型 DNA を含めた値が定量されてしまう。この影響を補正する為、
25 RNA 生合成前の試料溶液の 260nm の吸光度を同様な抽出操作を行って定量し、こ

の値を各定量値から差し引いた結果を用いて検量線を作成した。

上記方法によって得られた検量線を図 14 に示す。この検量線は鋳型 DNA に対しモル比で 1000 倍量のプローブを添加した場合である。実際の定量は、蛍光スペクトルの変化から蛍光強度比 (I_a/I_d) を求め、前述した検量線から RNA 生合成濃度を算出するものである。

プローブの添加量に応じた検量線をあらかじめ作成しておくことで蛍光スペクトルのモニタリングを行いながらリアルタイムで生合成された RNA 量を知ることができる。

(実施例 5)

インビトロ転写反応の開始及び完全長 RNA の同時モニタリング

2 組以上の蛍光標識プローブを同時に使用すると、インビトロ転写反応の開始と完全な長さ (目的の長さ) の RNA が合成されている様子を同時に確認することが可能である。

1 組は 5'末端近辺にハイブリダイズするプローブで転写反応の開始をモニタリングするためのものであり、他の 1 組は 3'末端近辺にハイブリダイズするプローブで、完全長 (目的の長さ) の RNA が生合成されているかどうかをモニタリングするためのものである。本実施例では 5'末端にハイブリダイズする 2 種類 1 組のプローブを BODIPY493/503、XRITC の組み合わせで、3'末端にハイブリダイズする 2 種類 1 組のプローブを BODIPY493/503、Cy5 の組み合わせで標識した。

<モニタリングに使用したプローブ>

5'末端にハイブリダイズするプローブ

XELF-1F ドナープローブ (5'-BODIPY493/503-GCCTTTTCCCATCTC)

XELF-1F アクセプタープローブ (5'-AGGCATACTTG(XRITC)AAGG)

3'末端にハイブリダイズするプローブ

XELF-3F ドナープローブ (5'-BODIPY493/503-TTAACTCTGATGGCC)

XELF-3F アクセプタープローブ (5'- ACCAGTCTTTT(Cy5)ACTA)

完全長の鋳型 DNA、または 3'末端を欠失させた鋳型 DNA を添加した 2 種類の転写反応液を以下のように調製した。

5 <転写反応液組成>

3'末端を欠失した鋳型 DNA を添加した場合

| | | |
|----|----------------------------------|-----------|
| | ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| | XELF1- α DNA (欠失) | 1pmol |
| | 10 \times Transcription buffer | 5 μ l |
| 10 | XELF-1F ドナープローブ | 820pmol |
| | XELF-1F アクセプタープローブ | 820pmol |
| | XELF-3F ドナープローブ | 820pmol |
| | XELF-3F アクセプタープローブ | 820pmol |
| | T3 RNA ポリメラーゼ | 5 μ l |

15 DEPEC 処理水で 50 μ l にした。

完全長の鋳型 DNA を添加した場合

| | | |
|----|----------------------------------|-----------|
| | ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| | XELF1- α DNA (完全長) | 0.8pmol |
| 20 | 10 \times Transcription buffer | 5 μ l |
| | XELF-1F ドナープローブ | 820pmol |
| | XELF-1F アクセプタープローブ | 820pmol |
| | XELF-3F ドナープローブ | 820pmol |
| | XELF-3F アクセプタープローブ | 820pmol |
| 25 | T3 RNA ポリメラーゼ | 5 μ l |

DEPEC 処理水で 50 μ l にした。

図 15A は、完全な長さの鋳型 DNA を用いた場合の蛍光スペクトルの経時変化であり、図 15B は欠失した鋳型 DNA を用いた場合の蛍光スペクトルの経時変化である。図 15A の蛍光スペクトルは、610nm 付近に XRITC の蛍光の増加と 670nm 付近に Cy 5 の蛍光の増加が同時に観察された。

5 一方図 15B の蛍光スペクトルは XRITC の蛍光の増加は観察されるが、Cy5 による蛍光スペクトルの変化は観察されなかった。

以上の結果から、適切な蛍光色素の組み合わせを有する 2 組以上のプローブを使用することによって、転写反応の開始と完全長の RNA の合成を同時にモニタリングすることが可能である。

10

(実施例 6)

転写反応速度のモニタリング

以下に T3 ポリメラーゼの添加量の異なる 2 組の転写反応液を調製した。

<転写反応液組成>

| | | |
|----|---------------------------------|-----------|
| 15 | ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| | XELF1- α DNA | 0.8pmol |
| | 10 \times Transcription buffe | 5 μ l |
| | XELF-1F ドナープローブ | 820pmol |
| | XELF-1F アクセプタープローブ | 820pmol |

20

上記反応液に T3 RNA ポリメラーゼを 5 μ l (図 16 : normal) 添加した転写反応液と 2.5 μ l (図 16 : 1/2) 添加した転写反応液 50 μ l を調製した。

蛍光スペクトルより求めた蛍光強度比 (I_a/I_d) を前記検量線を用いて RNA 濃度に変換し、反応時間に対してプロットした。

25 図 16 は、ポリメラーゼ量が減少すると RNA 生合成量も減少していた。従って、転写反応速度が速いか遅いかを判断するには、反応の初期を短い間隔でモニタリ

ングし、その経時変化の傾きを求めればよい。

(実施例 7)

プローブの添加量変化による効果

5 上記RNAの5'末端近辺と相補的な塩基配列をもつプローブ XELF-1F ドナー
 プローブ及びアクセプタープローブを鋳型 (テンプレート) DNA であるXEL
 F1- α DNA に対し、モル比で 200 倍、400 倍、800 倍添加し、以下の転写反応
 液を 50 μ l 調製し、蛍光スペクトルの経時変化を測定した。

<転写反応液組成>

10 鋳型 DNA : プローブ (1 : 200)

| | |
|----------------------------------|-----------|
| ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| XELF1- α DNA | 0.8pmol |
| 10 \times Transcription buffer | 5 μ l |
| XELF-1F ドナープローブ | 160pmol |
| 15 XELF-1F アクセプタープローブ | 160pmol |
| T3 RNA ポリメラーゼ | 5 μ l |

鋳型 DNA : プローブ (1 : 400)

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| XELF1- α DNA | 0.8pmol |
| 20 10 \times Transcription buffer | 5 μ l |
| XELF-1F ドナープローブ | 320pmol |
| XELF-1F アクセプタープローブ | 320pmol |
| T3 RNA ポリメラーゼ | 5 μ l |

鋳型 DNA : プローブ (1 : 800)

25 ATP、GTP、CTP、UTP 各 75mM

| | |
|---------------------|---------|
| XELF1- α DNA | 0.8pmol |
|---------------------|---------|

| | |
|-------------------------|-----------|
| 10×Transcription buffer | 5 μ l |
| XELF-1F ドナープローブ | 640pmol |
| XELF-1F アクセプタープローブ | 640pmol |
| T3 RNA ポリメラーゼ | 5 μ l |

5

10

15

20

25

この結果からドナーの蛍光波長における蛍光強度 (I_d) とアクセプターの蛍光波長における蛍光強度 (I_a) の比を転写反応時間に対してプロットした (図 17)。鋳型 DNA に対し小過剰にプローブを添加した場合 (1:200)、反応の初期段階での I_a/I_d 値の変化量は大きい、約 1.6 時間後以降は変化しない。これに対して鋳型 DNA に対しプローブを 400 倍添加した場合は約 4 時間後まで蛍光スペクトルは変化した。この結果は、RNA 合成は、鋳型の 200 倍以上おこることを示している。また、800 倍添加した場合においても約 4 時間後まで蛍光スペクトルは変化した。この結果は RNA の合成量が鋳型 DNA に対し 200 倍から 400 倍の間であることを示す。

また、鋳型 DNA に対し小過剰にプローブを添加した場合には、蛍光スペクトル変化が反応初期において大きく、精度よく転写反応がモニタリングできる。一方、鋳型 DNA に対し大過剰にプローブを添加した場合 (1:800)、 I_a/I_d 値の変化量が小さいため、転写反応の初期段階を蛍光スペクトルで精度よくモニタリングすることはできないが合成反応の終了点をモニターすることが可能となる。従って、本実施例の転写反応は、反応の初期段階をモニタリングするためには、鋳型 DNA とプローブの比を 1:200 に設定し、転写反応の終了までモニタリングするためには、鋳型 DNA とプローブの比を 1:400 或いは 1:800 に設定すればよいことが示される。

(実施例 8)

本発明に使用するプローブがハイブリダイズする当該 RNA 上の部位は任意であ

ることを示す実施例

5 X E L F 1 - α R N A の 2 次構造をコンピューターシミュレーションによって予測した（日立ソフトエンジニアリング製 DNASIS DNA-シーケンス入力解析システム）。一般にプローブがハイブリダイズしやすいと予想されるループ構造をとる部位（塩基配列番号 184-214）、およびプローブがハイブリダイズしにくいと予想されるステム構造をとる部位（塩基配列番号 346-375）をそれぞれ選択し、その部位の塩基配列と相補的な塩基配列をもつ 2 種類 1 組の蛍光標識プローブを作製した。

X E L F - 1 F ドナープローブ：184-199 の部位と相補的な塩基配列をもつ。

10 X E L F - 1 F アクセプタープローブ：200-214 の部位と相補的な塩基配列をもつ。

X E L F - 4 F ドナープローブ：346-360 の部位と相補的な塩基配列をもつ。

X E L F - 4 F アクセプタープローブ：361-375 の部位と相補的な塩基配列をもつ。

15 X E L F - 1 F ドナープローブと X E L F - 1 F アクセプタープローブを 1 対 1 に混合した溶液、および X E L F - 4 F ドナープローブと X E L F - 4 F アクセプタープローブを 1 対 1 に混合した溶液をそれぞれ調製し、蛍光スペクトルを測定した。次に、これらの溶液に X E L F 1 - α R N A をプローブに対して 1 対 1 の比率でそれぞれ添加して室温で 30 分反応させた後に蛍光スペクトルの変化を測定した。結果を図 18A に示す。X E L F - 1 F プローブに X E L F 1 - α R N A を加えたときには C y 5 の蛍光量が大きく増大した蛍光スペクトルが得られたが、X E L F - 4 F プローブに X E L F 1 - α R N A を加えたときには蛍光スペクトル変化は小さかった。蛍光スペクトルの変化はプローブが R N A にハイブリダイズして蛍光色素間に共鳴エネルギー移動がおこったことを示している。すなわち、図 18A の結果は、X E L F 1 - α R N A の 2 次構造から予想されたとおり、X E L F - 1 F プローブは X E L F 1 - α R N A によくハイブリダイズす

るが、XELF-4FプローブはXELF1- α RNAにあまりハイブリダイズしないことを示している。

次に、これらのプローブを用いて本発明のインビトロ転写RNA合成反応モニタリング法を行った。XELF-1FドナープローブとXELF-1Fアクセプタープローブを含む転写反応液と、XELF-4FドナープローブとXELF-4Fアクセプタープローブを含む転写反応液をそれぞれ調製し、蛍光スペクトルの経時変化をモニターした。

<反応転写液の組成>

XELF-1FドナープローブとXELF-1Fアクセプタープローブ

| | | |
|----|----------------------------------|-----------|
| 10 | XELF1- α DNA | 0.8pmol |
| | 10 \times Transcription buffer | 5 μ l |
| | XELF-1F ドナープローブ | 640pmol |
| | XELF-1F アクセプタープローブ | 640pmol |
| | T3 RNA ポリメラーゼ | 5 μ l |

15 XELF-4FドナープローブとXELF-4Fアクセプタープローブ

| | | |
|----|----------------------------------|-----------|
| | XELF1- α DNA | 0.8pmol |
| | 10 \times Transcription buffer | 5 μ l |
| | XELF-4F ドナープローブ | 640pmol |
| | XELF-4F アクセプタープローブ | 640pmol |
| 20 | T3 RNA ポリメラーゼ | 5 μ l |

結果を図 18B および C に示す。図 18B および C から明らかなように、XELF-4Fプローブを使用したときにも、XELF-1Fプローブを使用したときと同様の蛍光スペクトルの経時変化が観察された。これらの結果は、特有の2次構造をとっているRNAにハイブリダイズしない塩基配列をもつプローブであっても、転写合成反応液にあらかじめ加えておいたときには合成されてくるRNA

にハイブリダイズすることを示している。

すなわち、本発明にもとづくRNA転写合成反応のモニタリングを行うときに使用するプローブは当該RNAの一部と相補的な塩基配列をもっていればよく、RNA上のどの部位にハイブリダイズさせるかの選択は任意であることがわかる。

5

(実施例9)

隣接プローブによるインビトロ転写RNA合成のモニタリング

前記実施例1から8で使用したプローブは、合成されたRNAとハイブリダイズすると、2種類のプローブは連続してハイブリダイズする。

10

本発明で使用するプローブが、連続してハイブリダイズするプローブに限定されず、互いに隣接してハイブリダイズするようなプローブでも使用可能であることを以下の実験で確認した。

<使用したプローブと塩基配列>

連続してハイブリダイズするプローブ

15

XELF-1F ドナープローブ 5'-BODIPY493/503-AGCCTTTTCCCATCTC-3'

XELF-1F アクセプタープローブ 5'-AGGCATACTTG(Cy5)AAGG-3'

隣接してハイブリダイズするプローブ

XELF-1F ドナープローブ 5'-BODIPY493/503-AGCCTTTTCCCATCTC-3'

XELF-5F アクセプタープローブ 5'-ACCCAGGCATACTTG (Cy5) -3'

20

RNAとのハイブリッド体において、プローブ間の一本鎖の部分は4塩基となる。

<反応転写液の組成>

連続プローブを使用した場合

| | |
|----------------------------------|------------|
| ATP、GTP、CTP、UTP | 各 75mM |
| XELF1- α DNA | 6 pmol |
| 10 \times Transcription buffer | 10 μ l |
| XELF-1F ドナープローブ | 432pmol |

25

XELF-5F アクセプタープローブ 432pmol

T3 RNA ポリメラーゼ 10 μ l

DEPEC 処理水で 100 μ l にした。

隣接プローブを使用した場合

5 ATP、GTP、CTP、UTP 各 75mM

XELF1- α DNA 6pmol

10 \times Transcription buffer 10 μ l

XELF-1F ドナープローブ 432pmol

XELF-1F アクセプタープローブ 432pmol

10 T3 RNA ポリメラーゼ 10 μ l

DEPEC 処理水で 100 μ l にした。

上記反応液を 37°C で反応させ、一定時間毎に 5 μ l ずつ反応液を採取し、145 μ l の 20mM EDTA を含む 1xSSC で希釈した後、蛍光スペクトル測定を行った。

その結果、連続してハイブリダイズするプローブと同様、隣接してハイブリダイズするプローブを用いても反応時間の経過に従って、BODIPY493/503 に基づく蛍光が減少し、Cy5 に基づく蛍光が増加した。

520nm の蛍光強度(I_d)と 670nm の蛍光強度(I_a) の比(I_a/I_d)を時間に対してプロットした結果を、連続プローブと隣接プローブで比較したところ、蛍光強度比の経時変化は一致した。

20 従って、本発明に係わるプローブは連続してハイブリダイズするプローブに限定されず、2種類のプローブがRNAの一部に隣接してハイブリダイズするプローブでも使用可能である。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

AGCCTTTTCC CATCTC 16

10

配列番号 : 2

配列の長さ : 15

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

15 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

AGGCATACTT GAAGG 15

20

配列番号 : 3

配列の長さ : 15

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

25

配列の種類 : DNA

配列

TCTTGATGTA TGTGC 15

配列番号 : 4

配列の長さ : 15

5 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

10 GGTTGTAACC AATCT 15

配列番号 : 5

配列の長さ : 16

配列の型 : 核酸

15 鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

TTAAACTCTG ATGGCC 16

20

配列番号 : 6

配列の長さ : 15

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

25 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

ACCAGTCTTT TACTA 15

配列番号 : 7

5 配列の長さ : 15

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

10 配列

AGTACCAGTG ATCAT 15

配列番号 : 8

配列の長さ : 15

15 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列

20 ACAGTCAGCC TGAGA 15

配列番号 : 9

配列の長さ : 15

配列の型 : 核酸

25 鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：DNA

配列

TCTAGTTGGT CTGTC 15

5 配列番号：10

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：DNA

配列

GCAGACTTCT CATCT 15

配列番号：11

15 配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

20 配列

ACCCAGGCAT ACTTG 15

請求の範囲

1. RNA転写合成反応系中の、転写合成されたRNAの塩基配列の一部にハイブリダイズする塩基配列を有する2種類1組のオリゴヌクレオチドプローブであって、エネルギードナー蛍光分子でラベル化されたドナープローブと、エネルギーアクセプター蛍光分子でラベル化されたアクセプタープローブとからなる前記オリゴヌクレオチドプローブの蛍光を測定することにより、前記RNA転写合成反応の開始、終了及び完全長のRNAの合成をモニターする方法。

2. RNA転写合成反応系中の、転写合成されたRNAの塩基配列の一部にハイブリダイズする塩基配列を有する2種類1組のオリゴヌクレオチドプローブであって、エネルギードナー蛍光分子でラベル化されたドナープローブと、エネルギーアクセプター蛍光分子でラベル化されたアクセプタープローブとからなる前記オリゴヌクレオチドプローブの蛍光を測定することにより、前記RNA転写合成反応による転写合成されたRNAを定量する方法。

3. RNA転写合成反応系中の、転写合成されたRNAの塩基配列の一部にハイブリダイズする塩基配列を有する2種類1組のオリゴヌクレオチドプローブであって、エネルギードナー蛍光分子でラベル化されたドナープローブと、エネルギーアクセプター蛍光分子でラベル化されたアクセプタープローブとからなる、少なくとも2組以上の前記オリゴヌクレオチドプローブの蛍光を測定することにより、前記RNA転写合成反応における転写の開始と完全長RNAを同時にモニターする方法。

4. インビトロ転写RNA合成反応のモニター装置であって、RNA転写反応を行う合成反応装置と、反応装置からサンプル溶液を導入するサンプル導入手段と、前記サンプル溶液の濃度を調節する溶媒混合装置（測定試料調製装置）と、

蛍光測定装置と、を備えることを特徴とする装置。

図1A

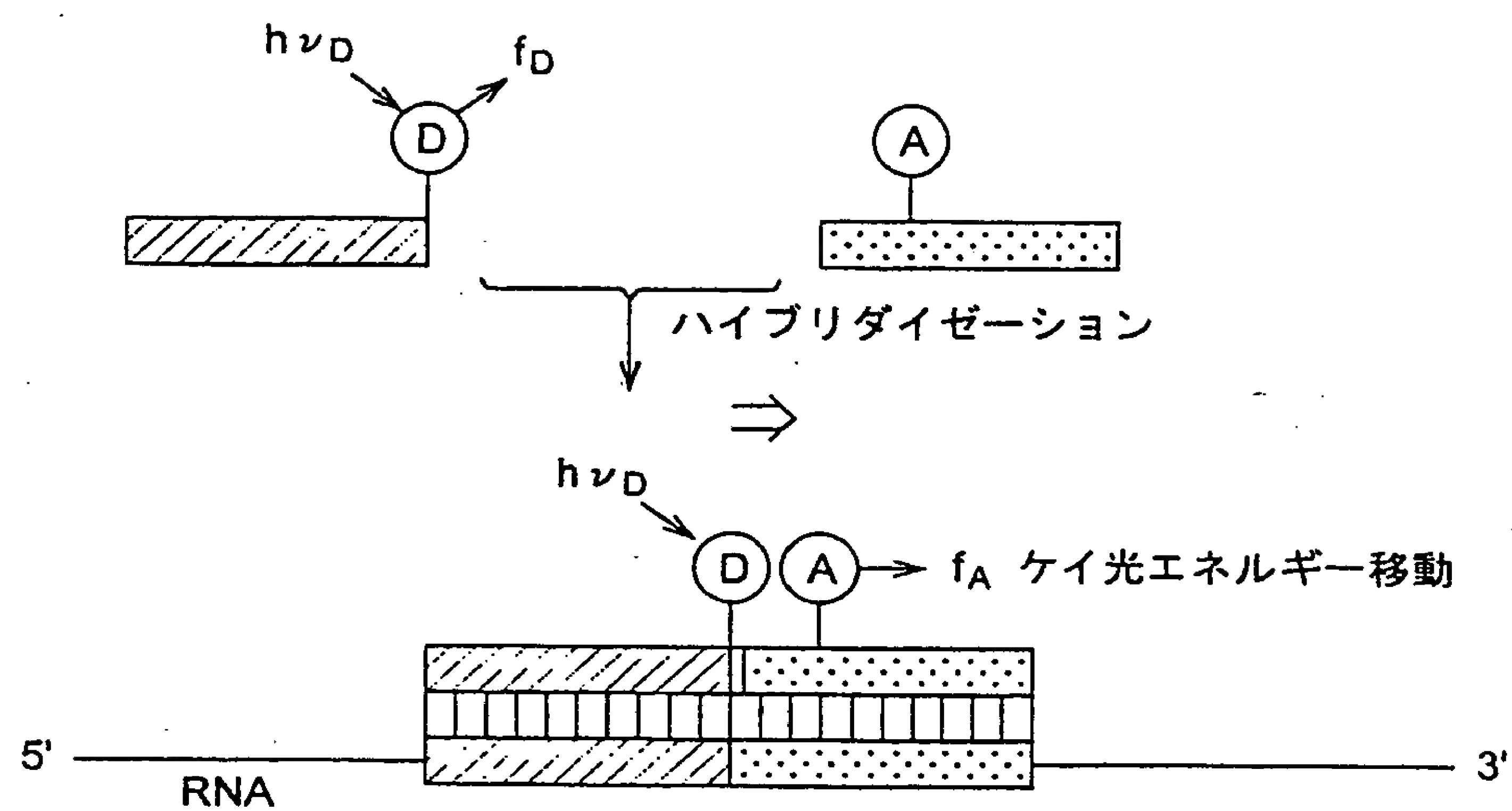


図1B

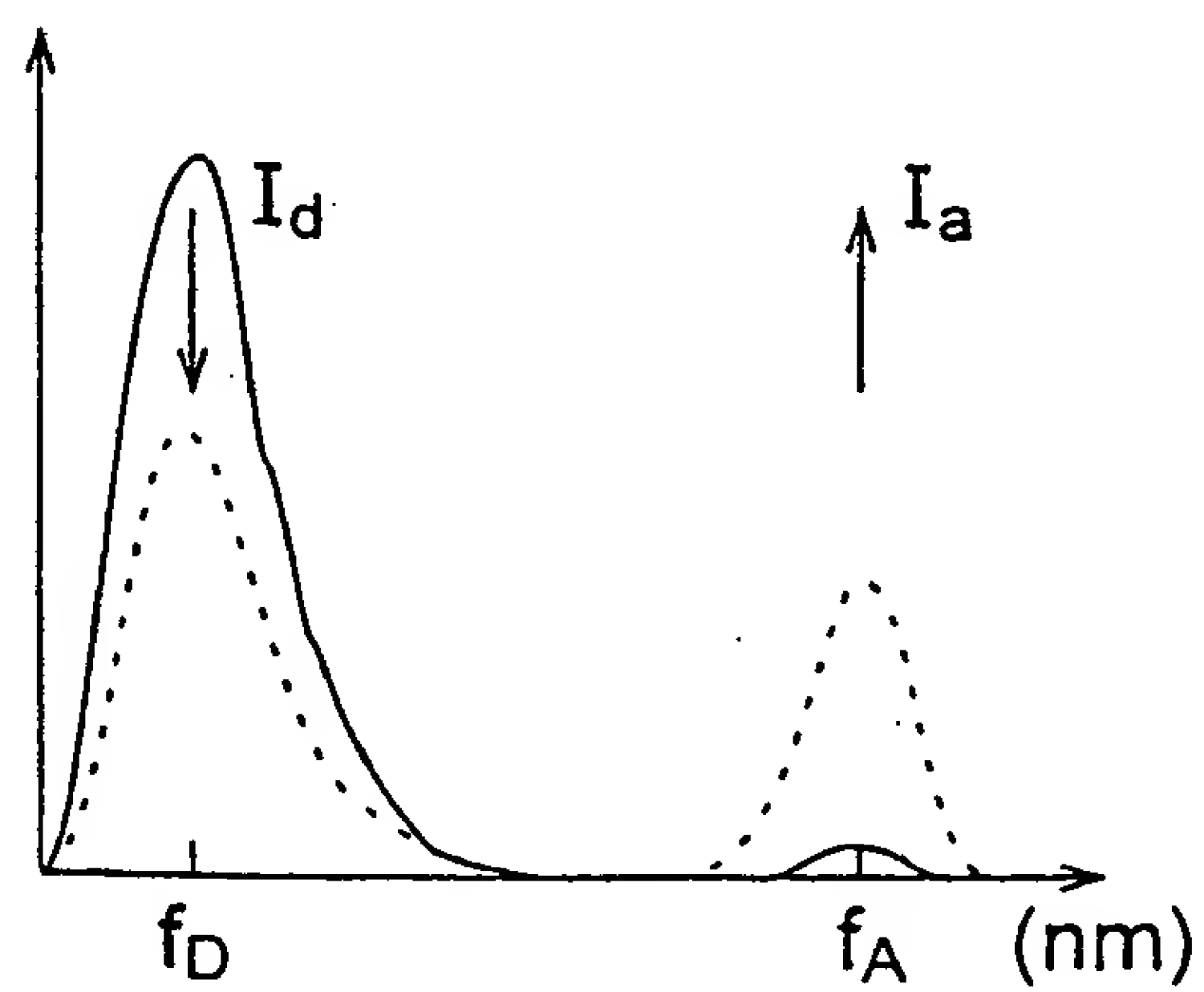
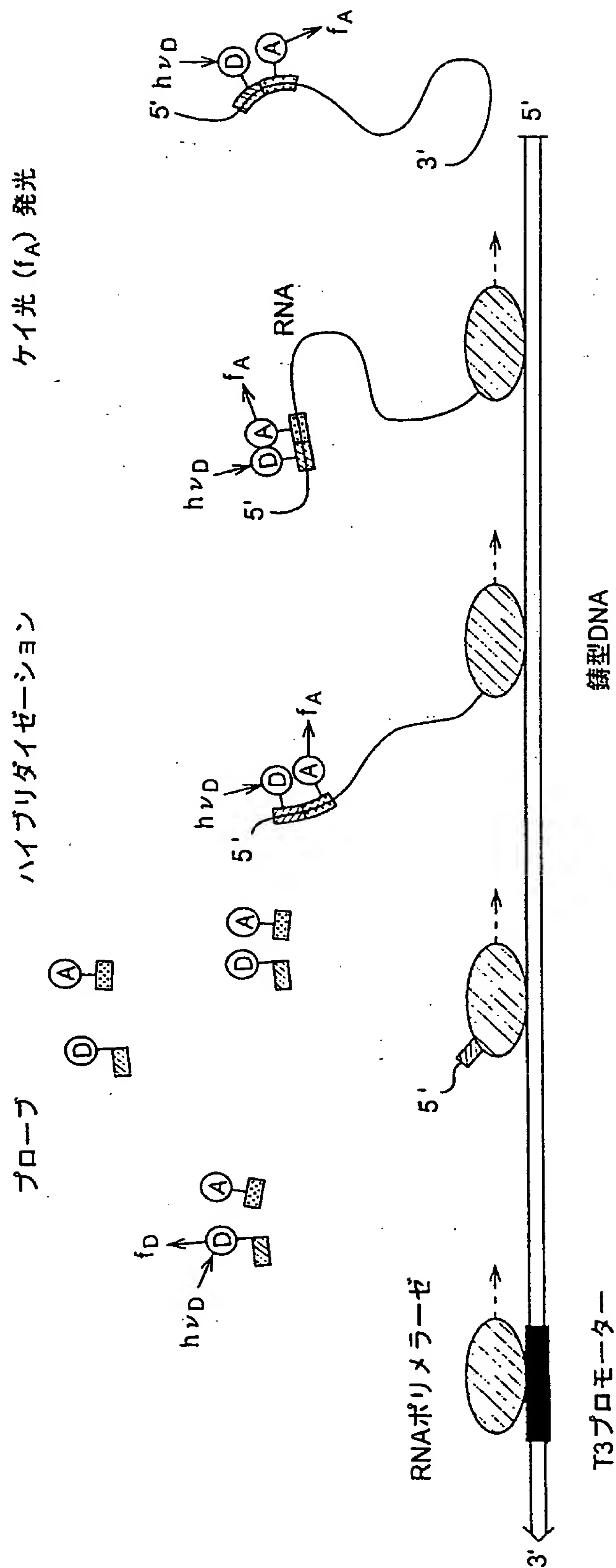
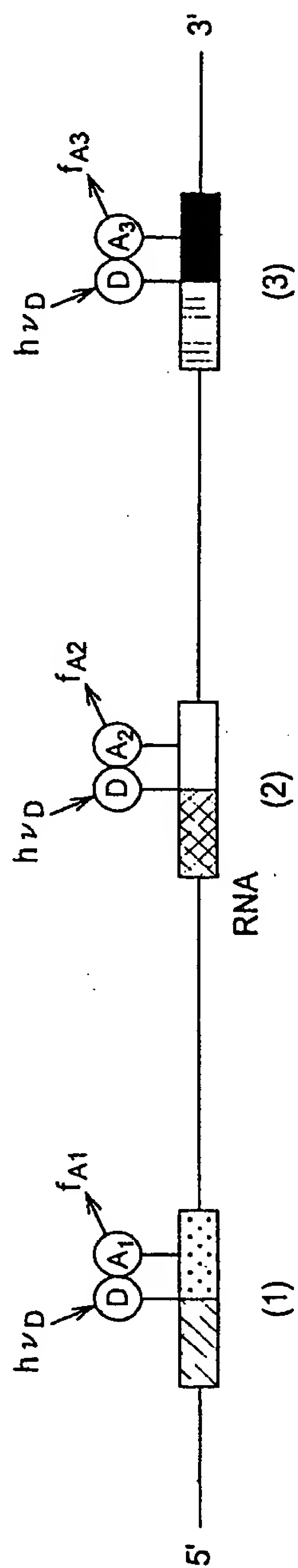


図2



3A



3B

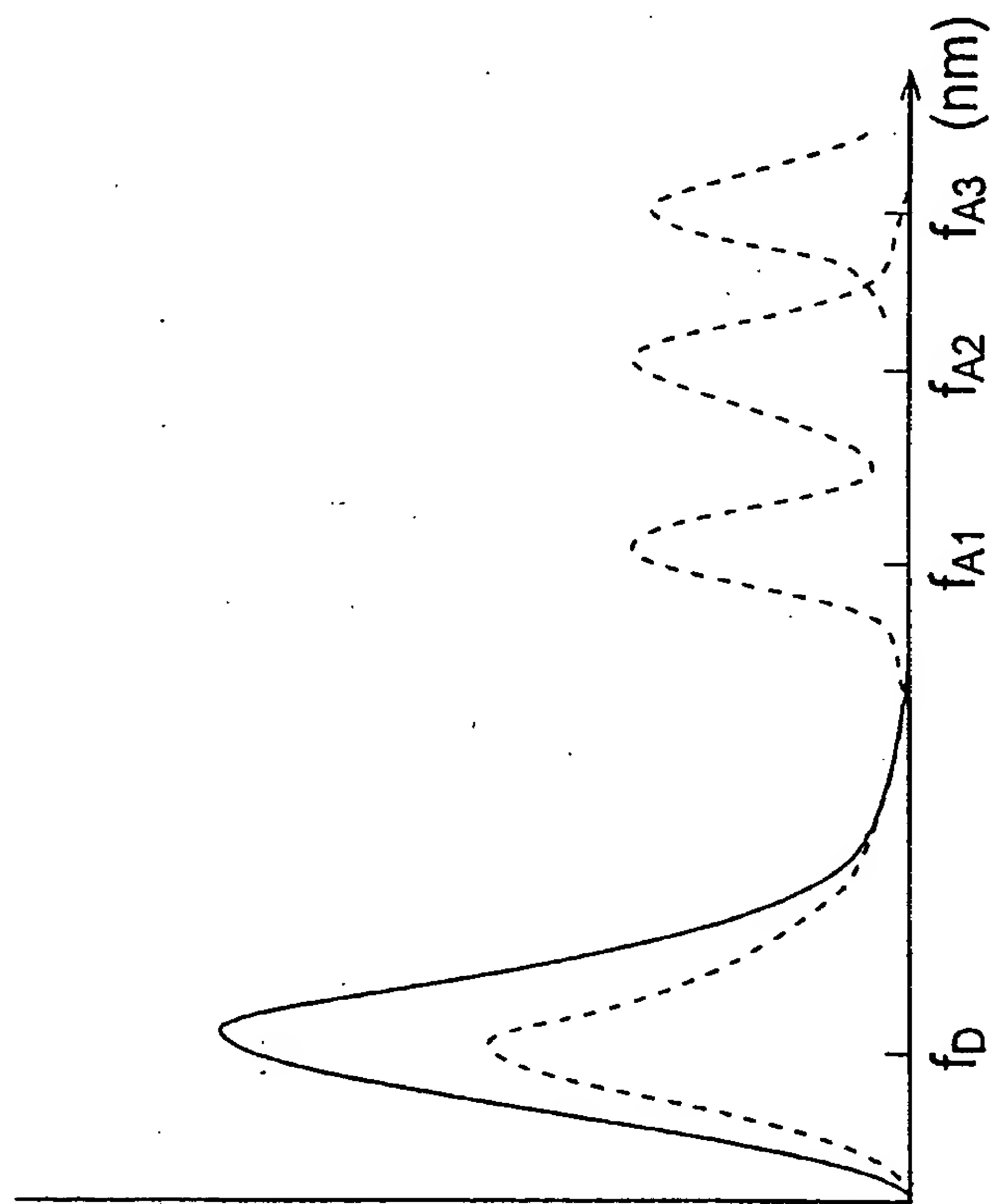


図 4

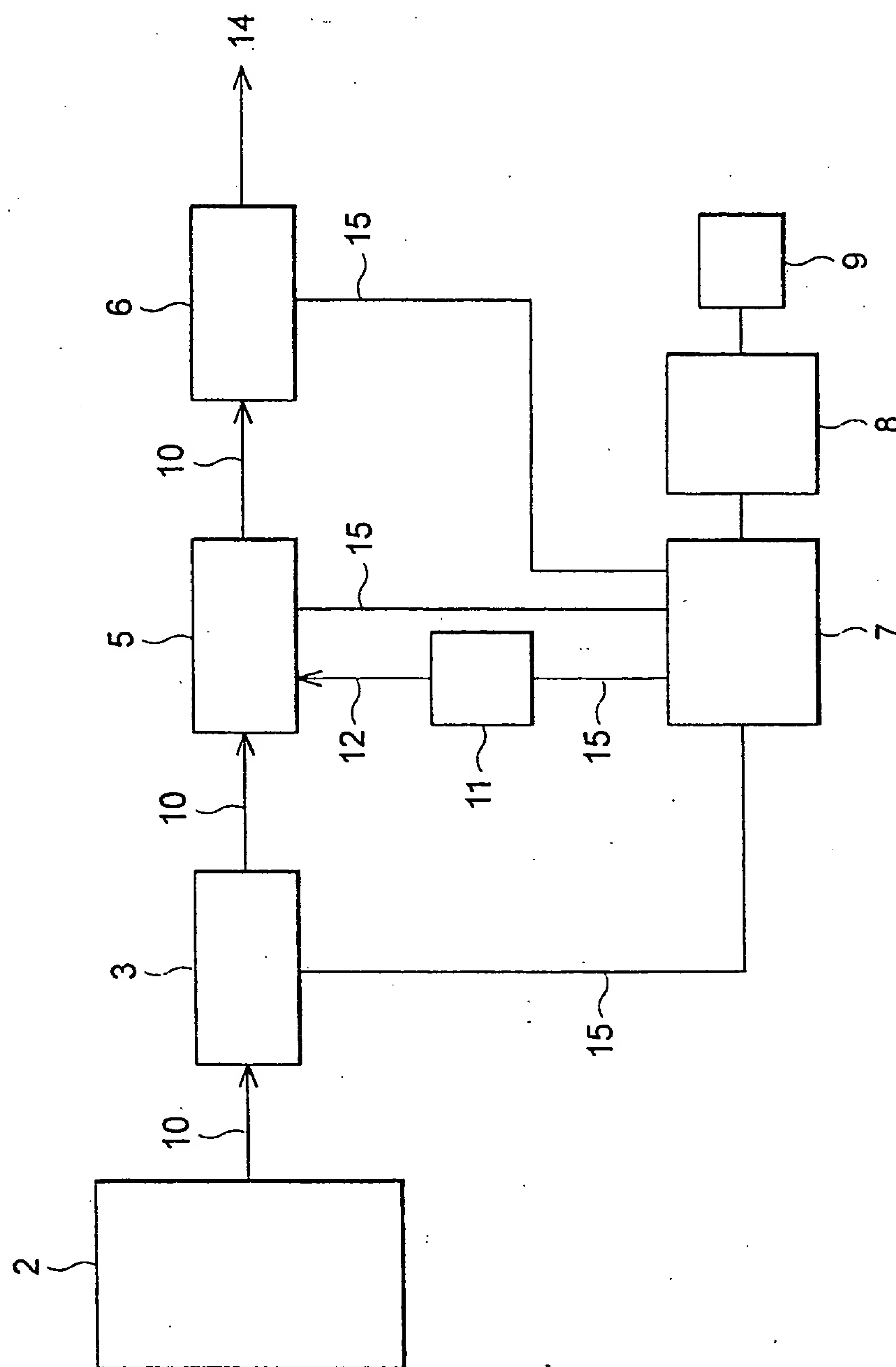


図 5

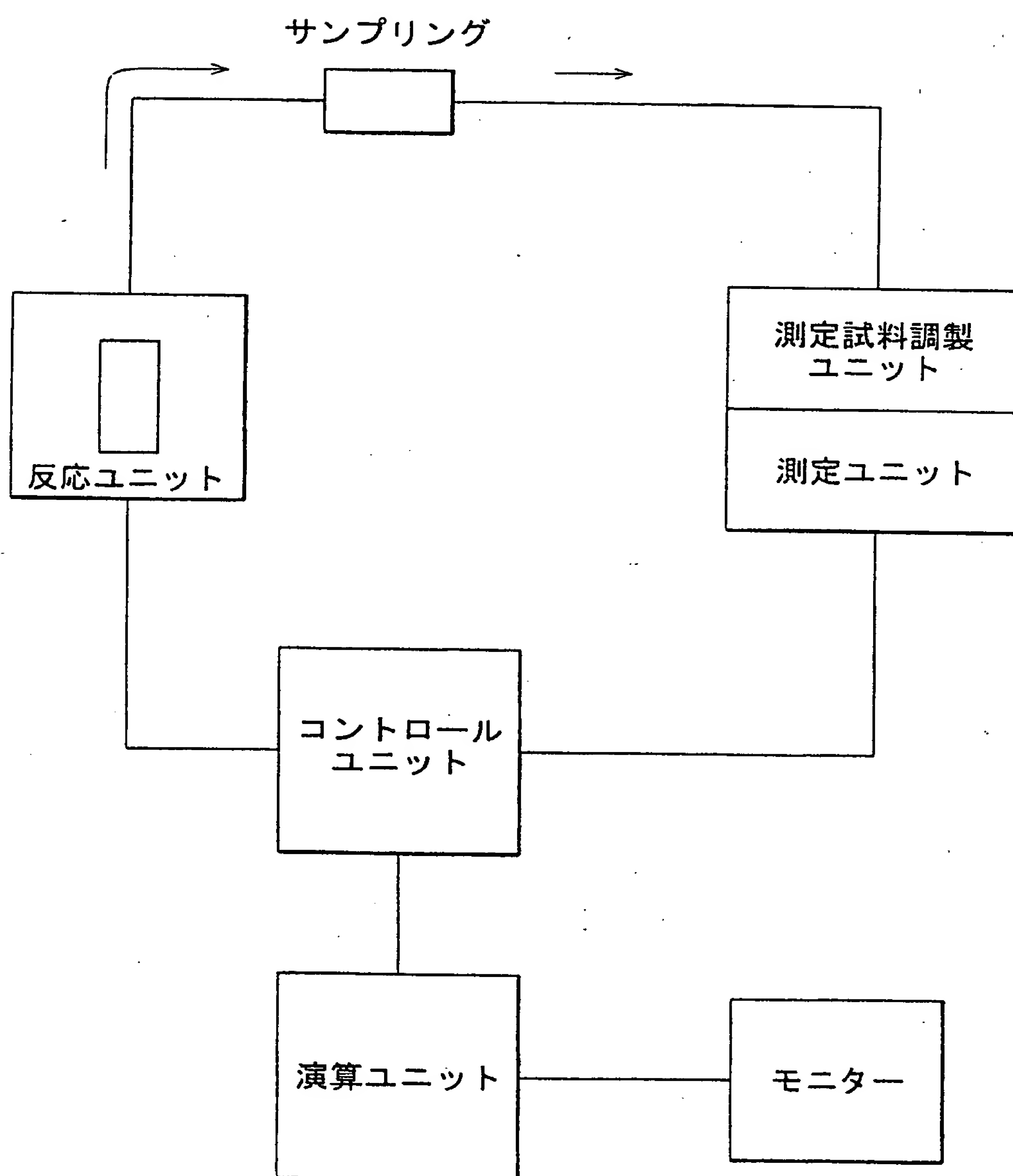


図 6

測定ユニット 2 波長測定

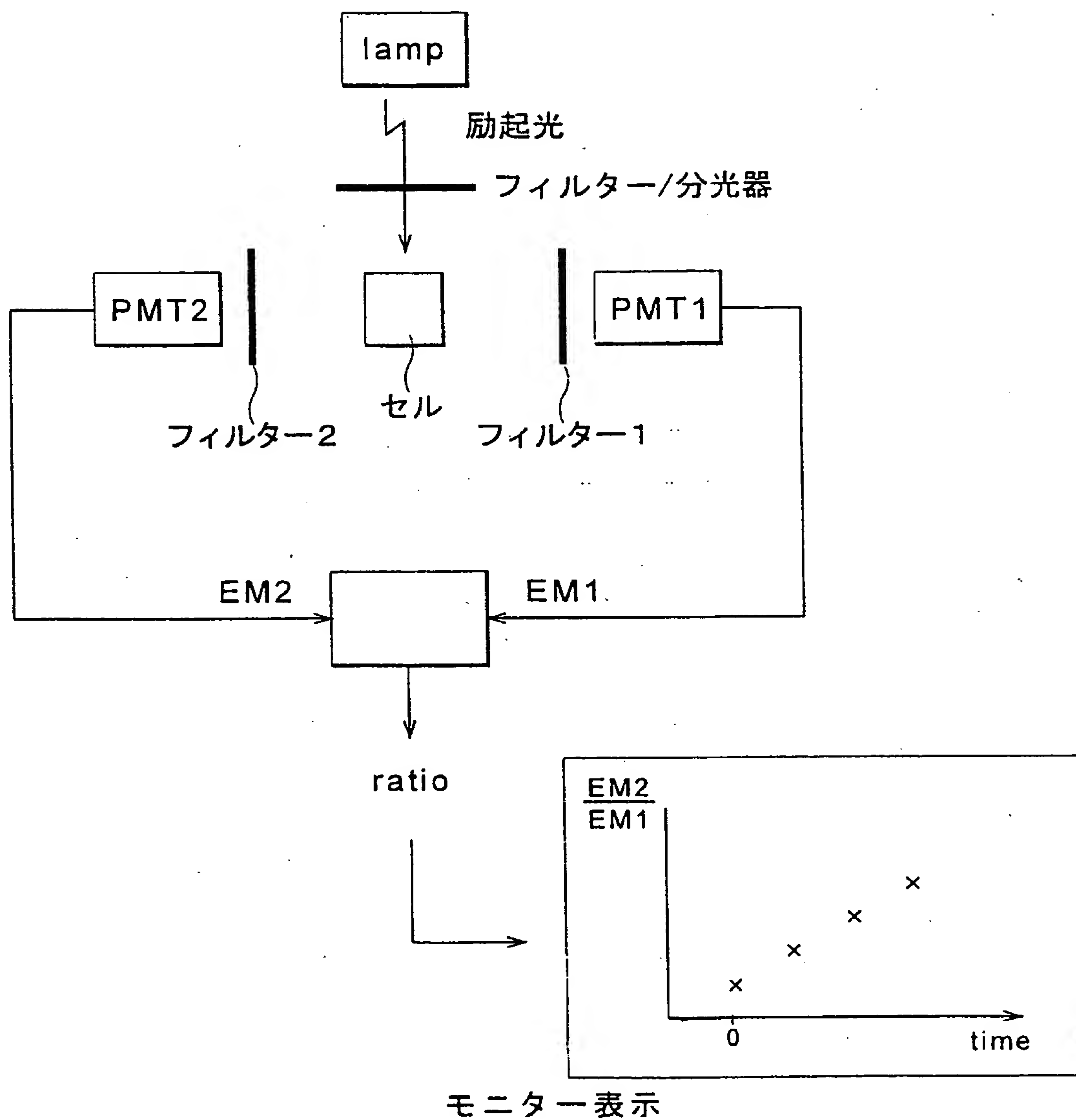


図 7

3 波長測定

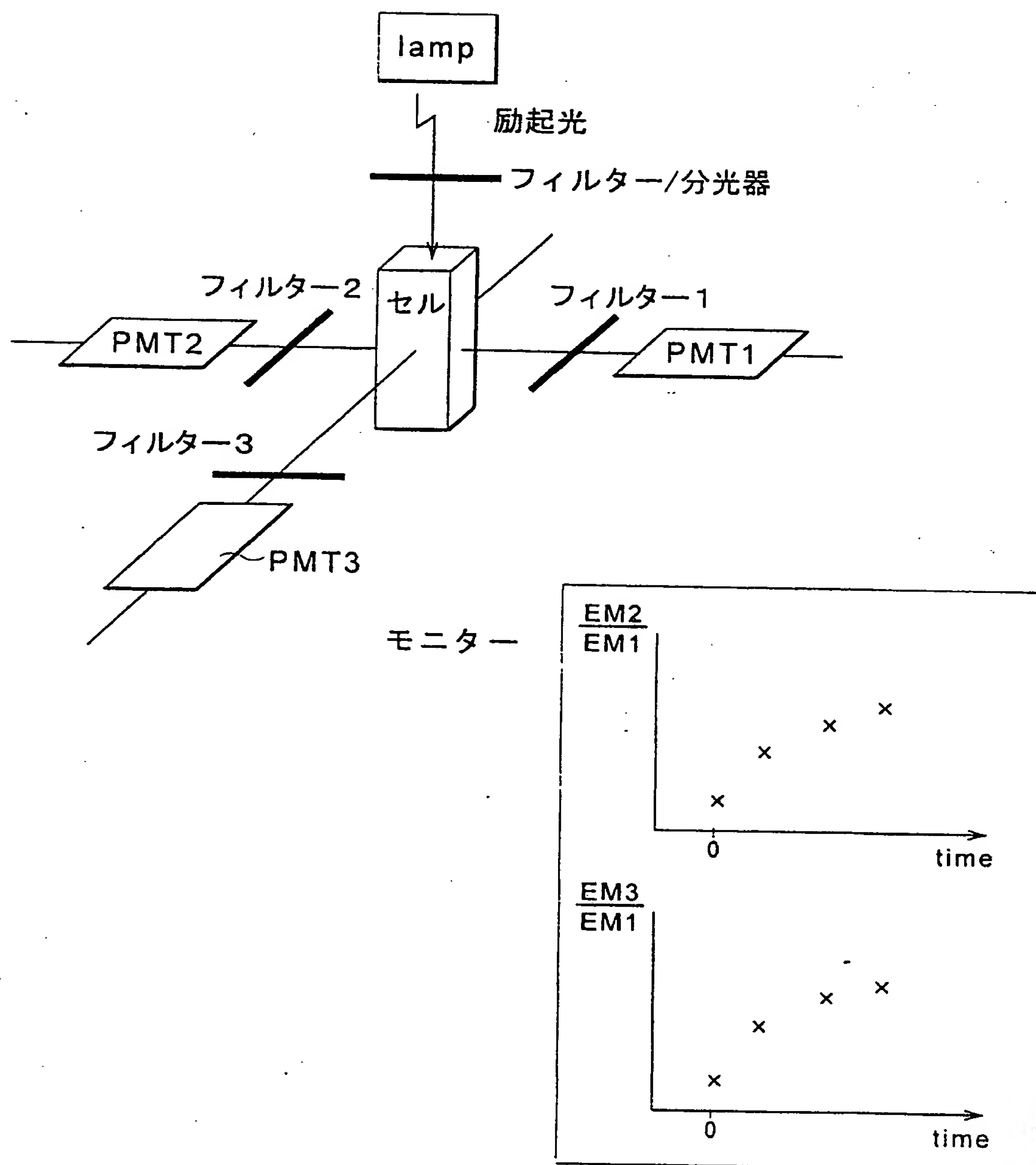


図 8

マイクロプレートリーダー型インビトロ転写反応モニター装置の簡略図

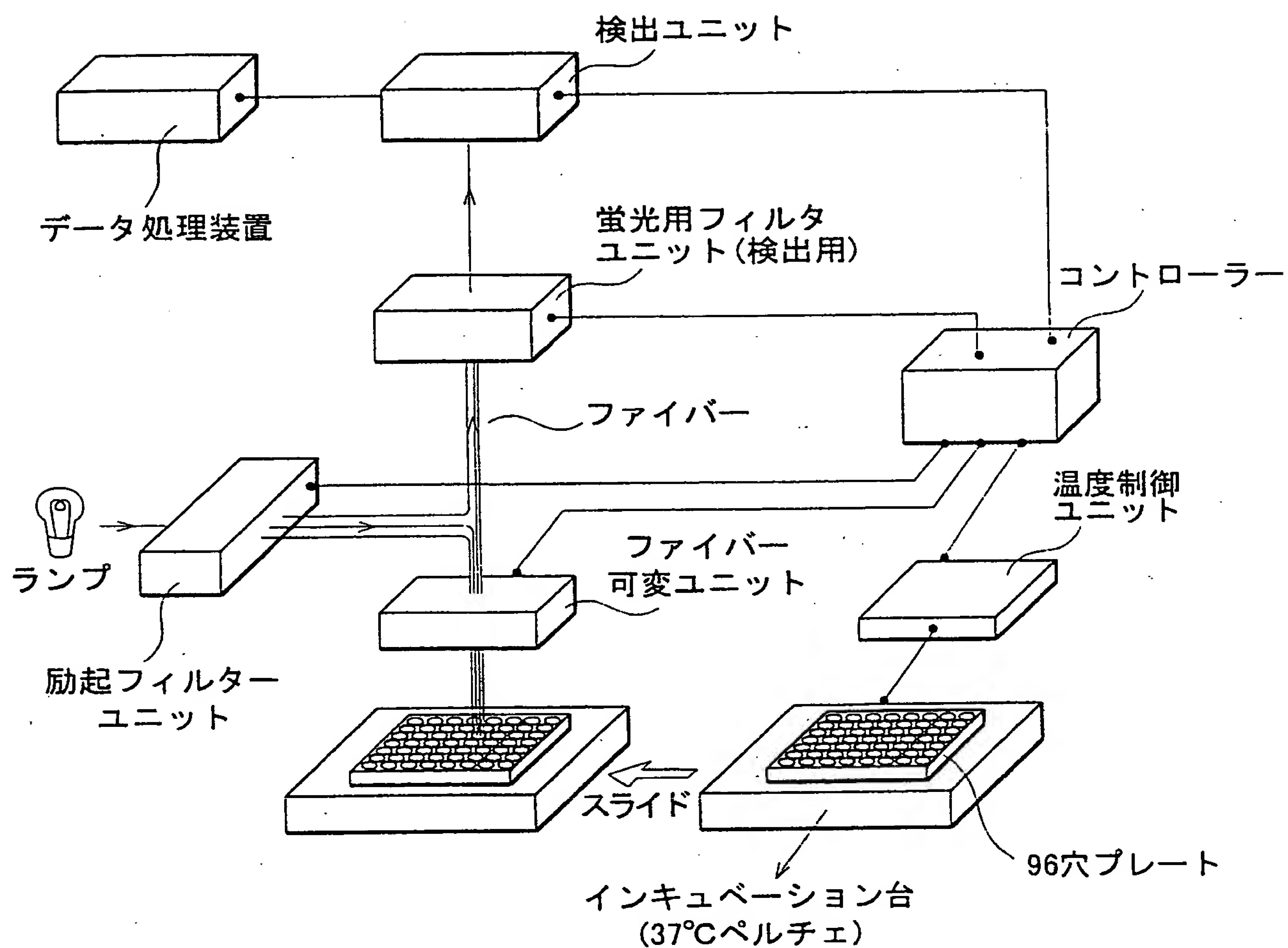


図 9

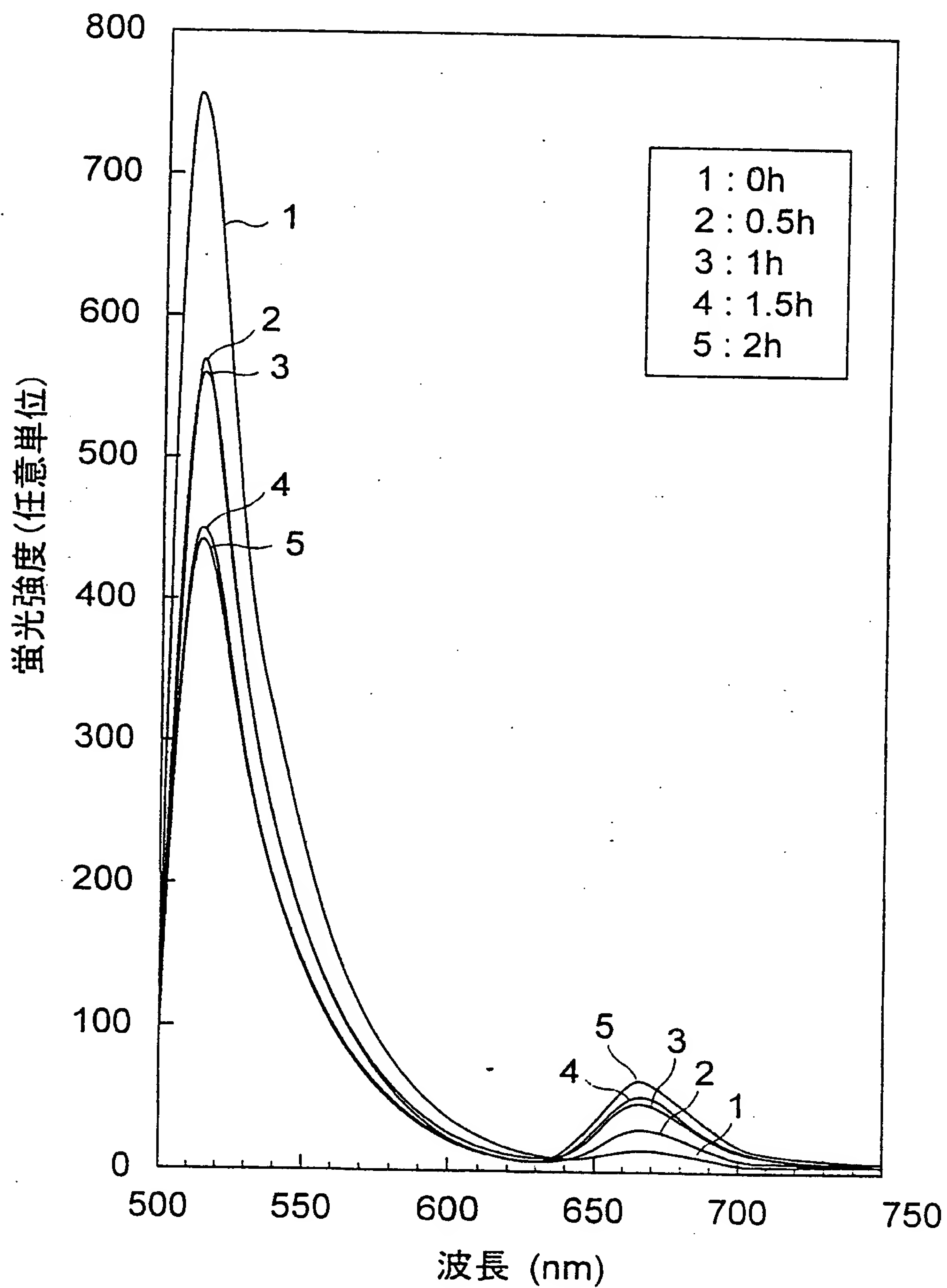


図10A

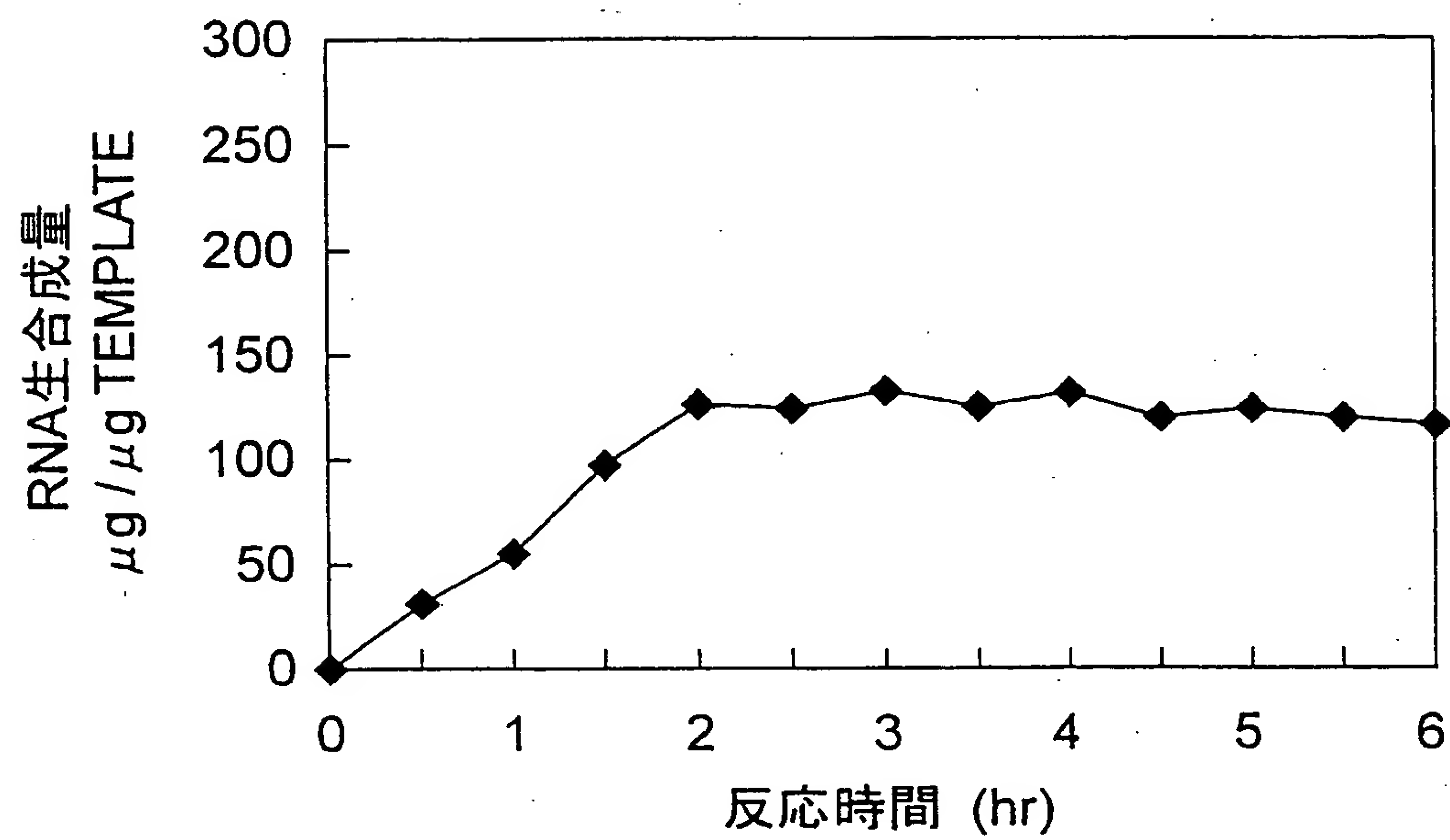


図10B

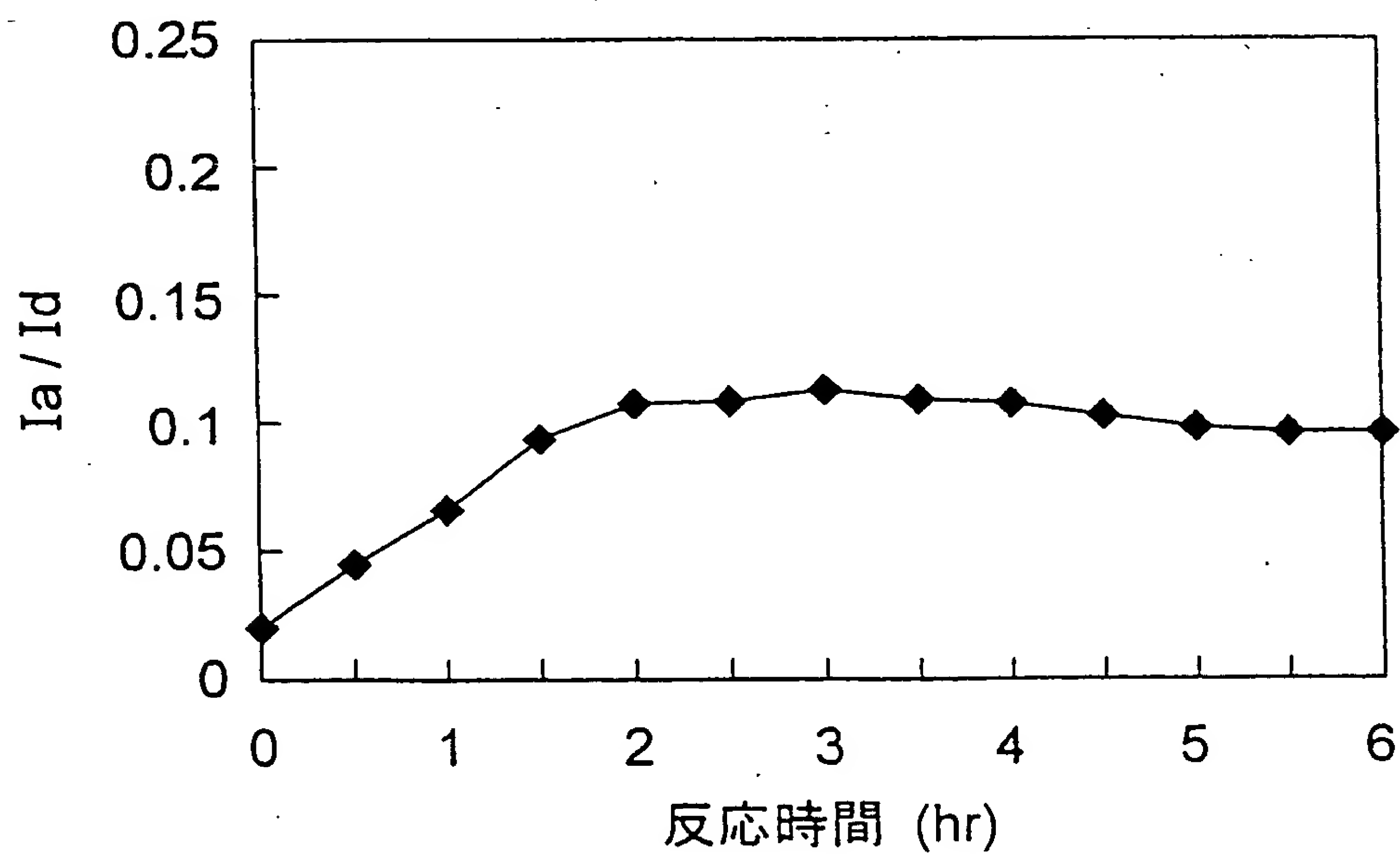


図11

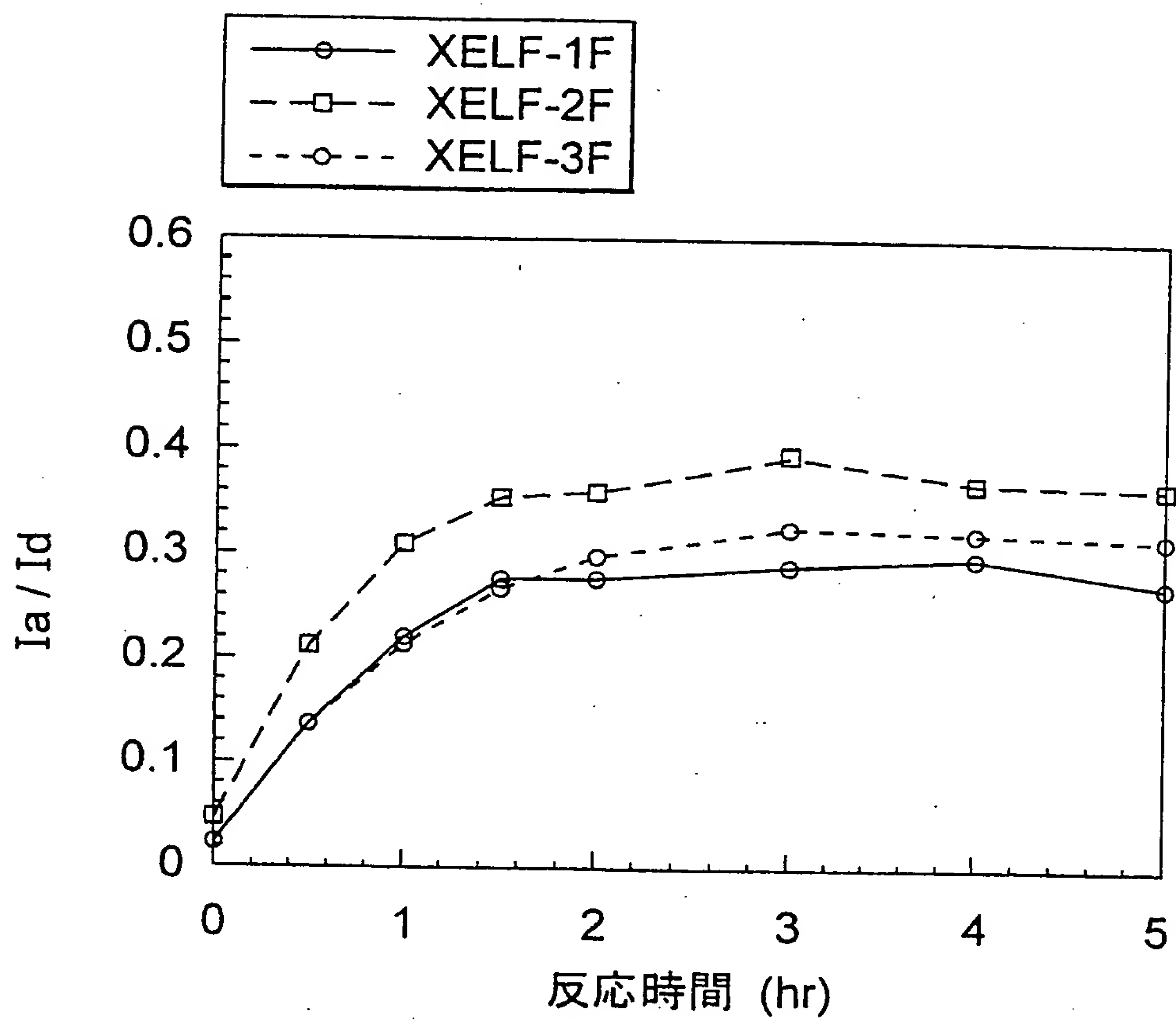


図12A

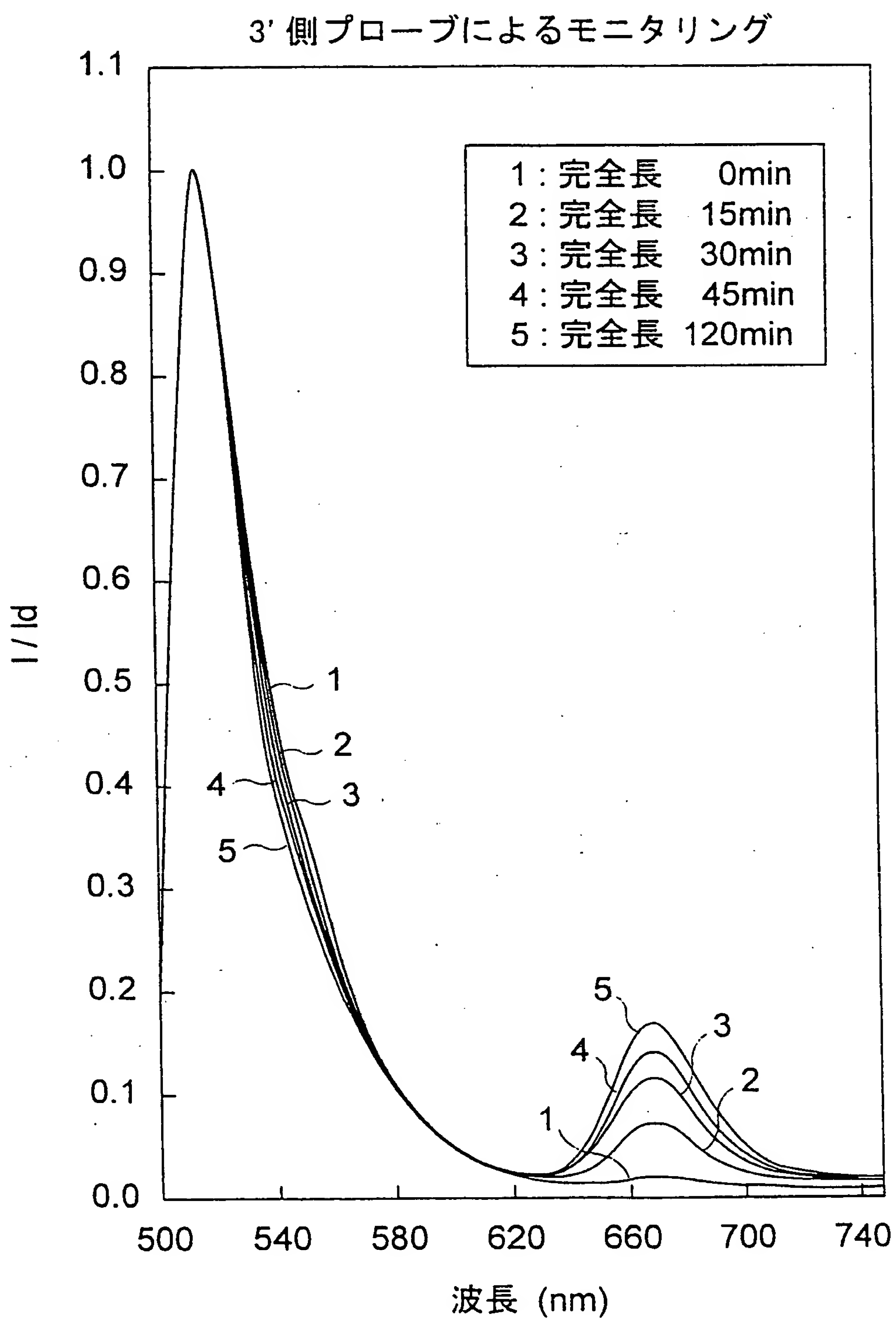


図12B

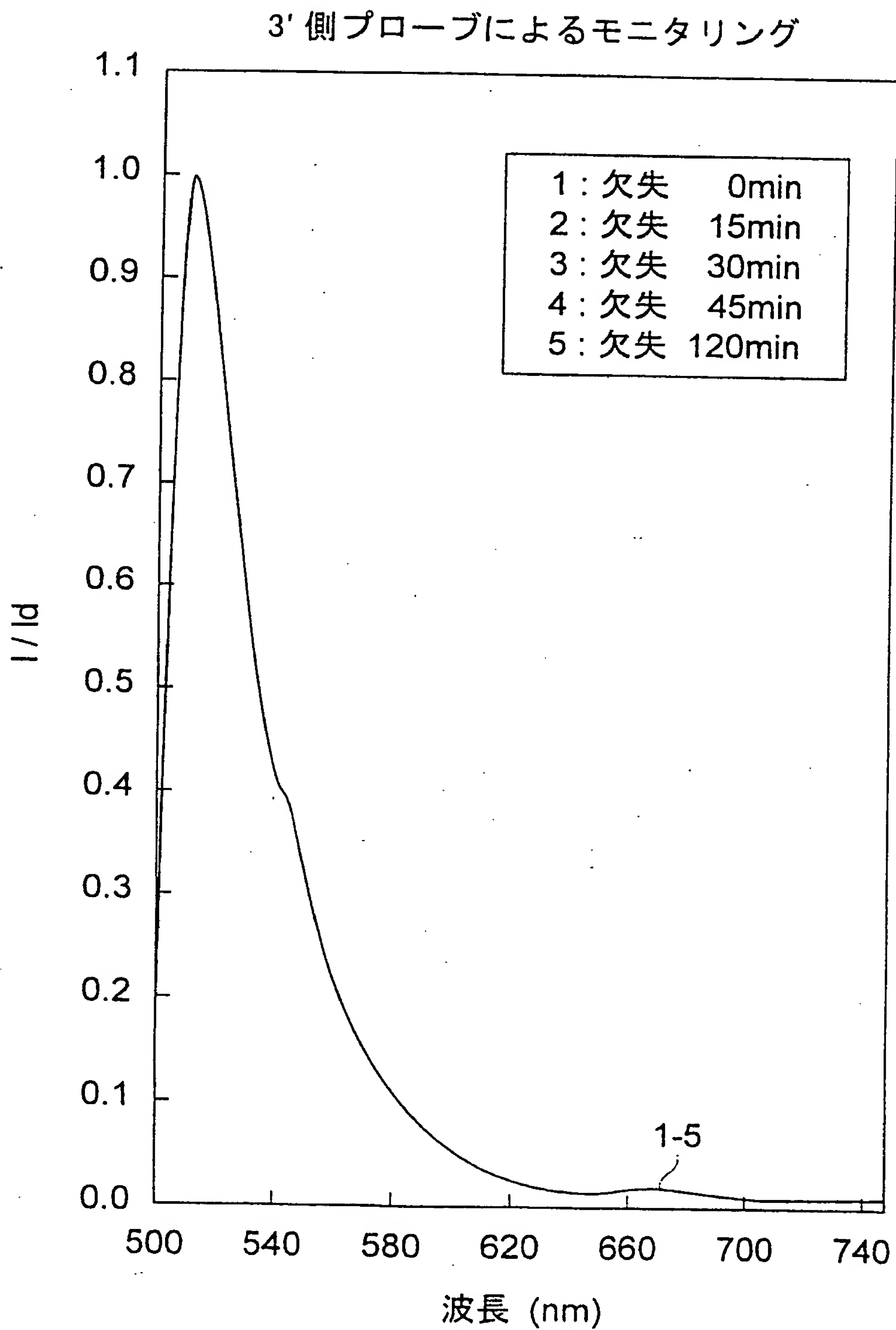


図13A

5' 側プローブによるモニタリング

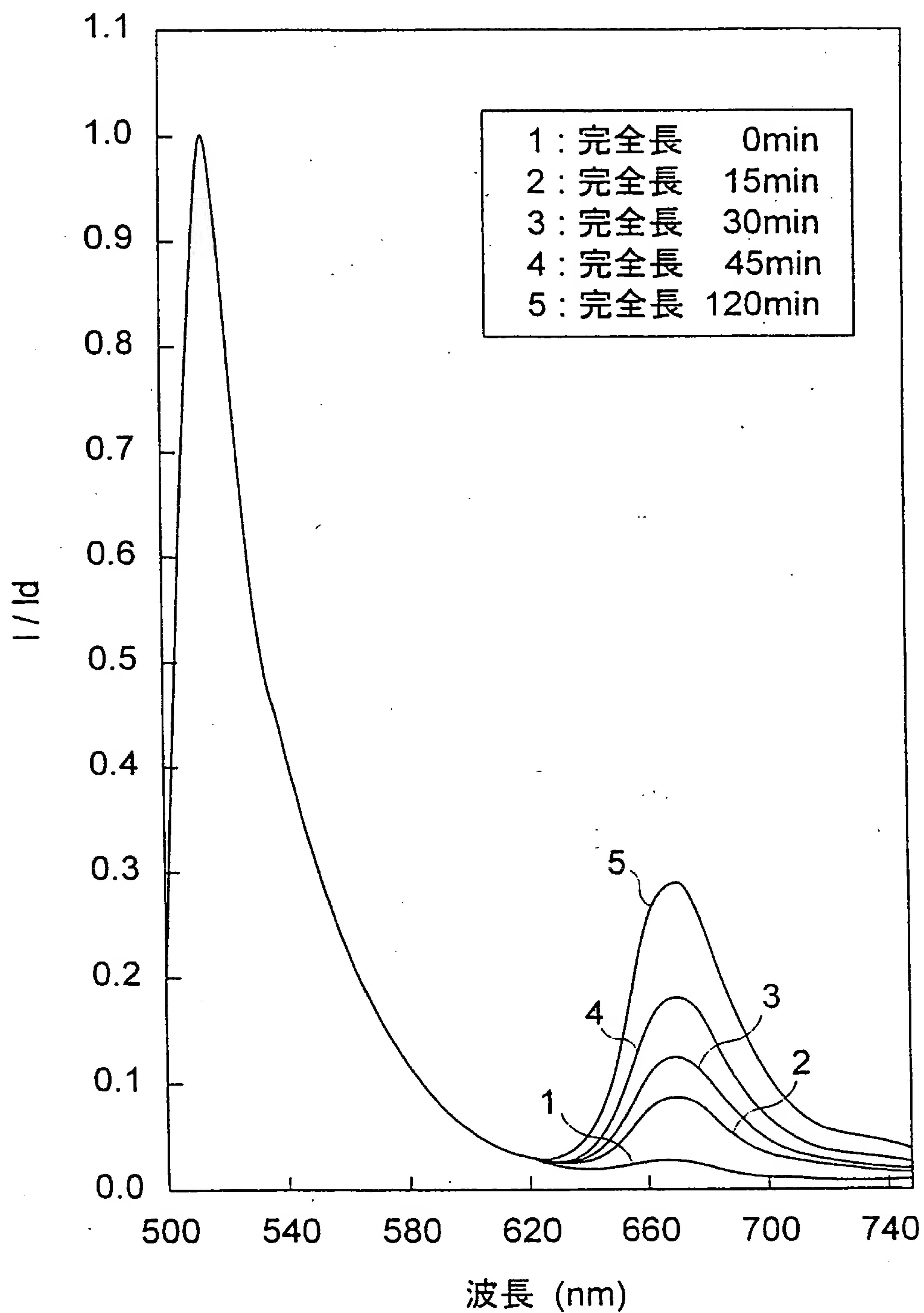


図13B

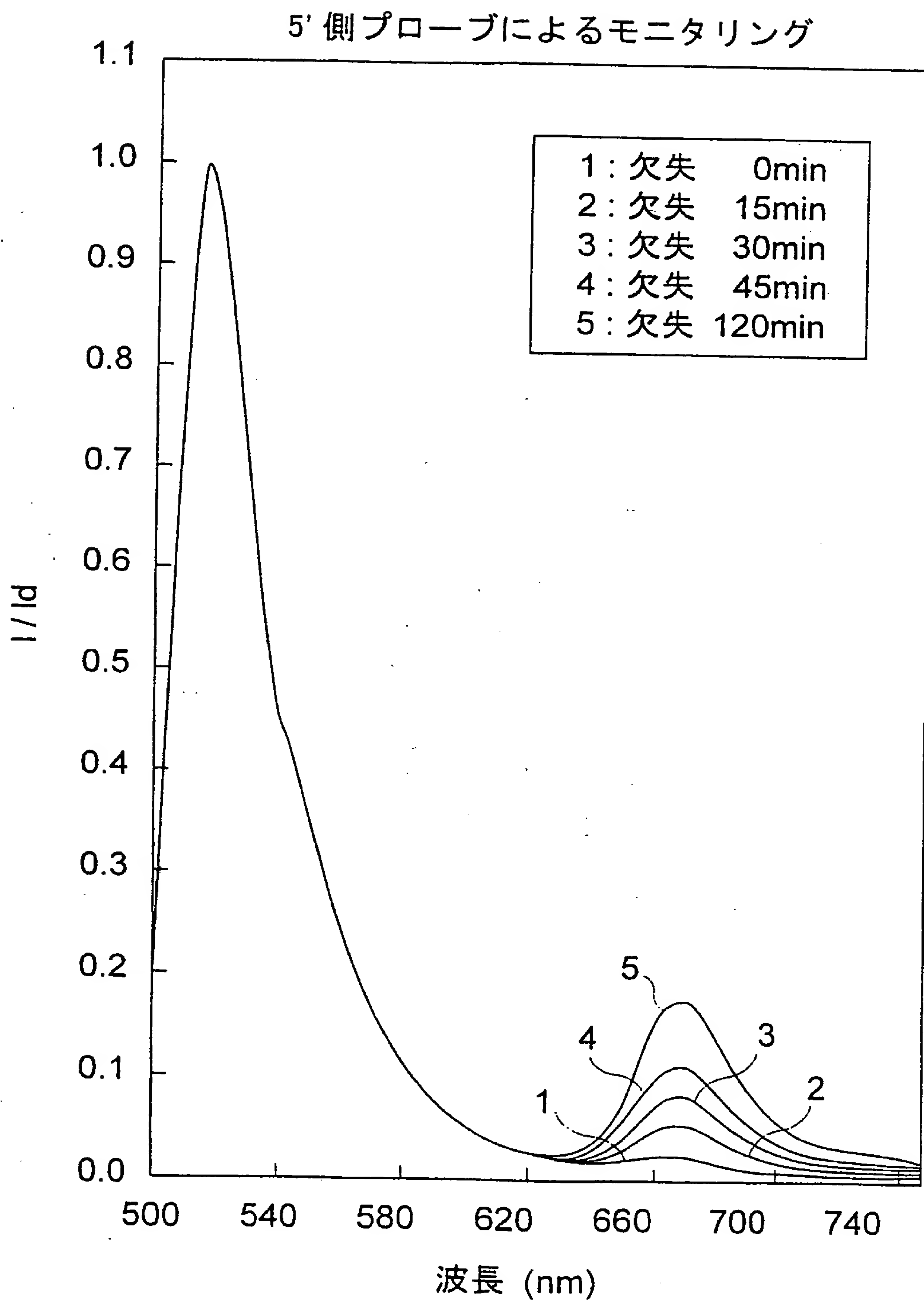


図14

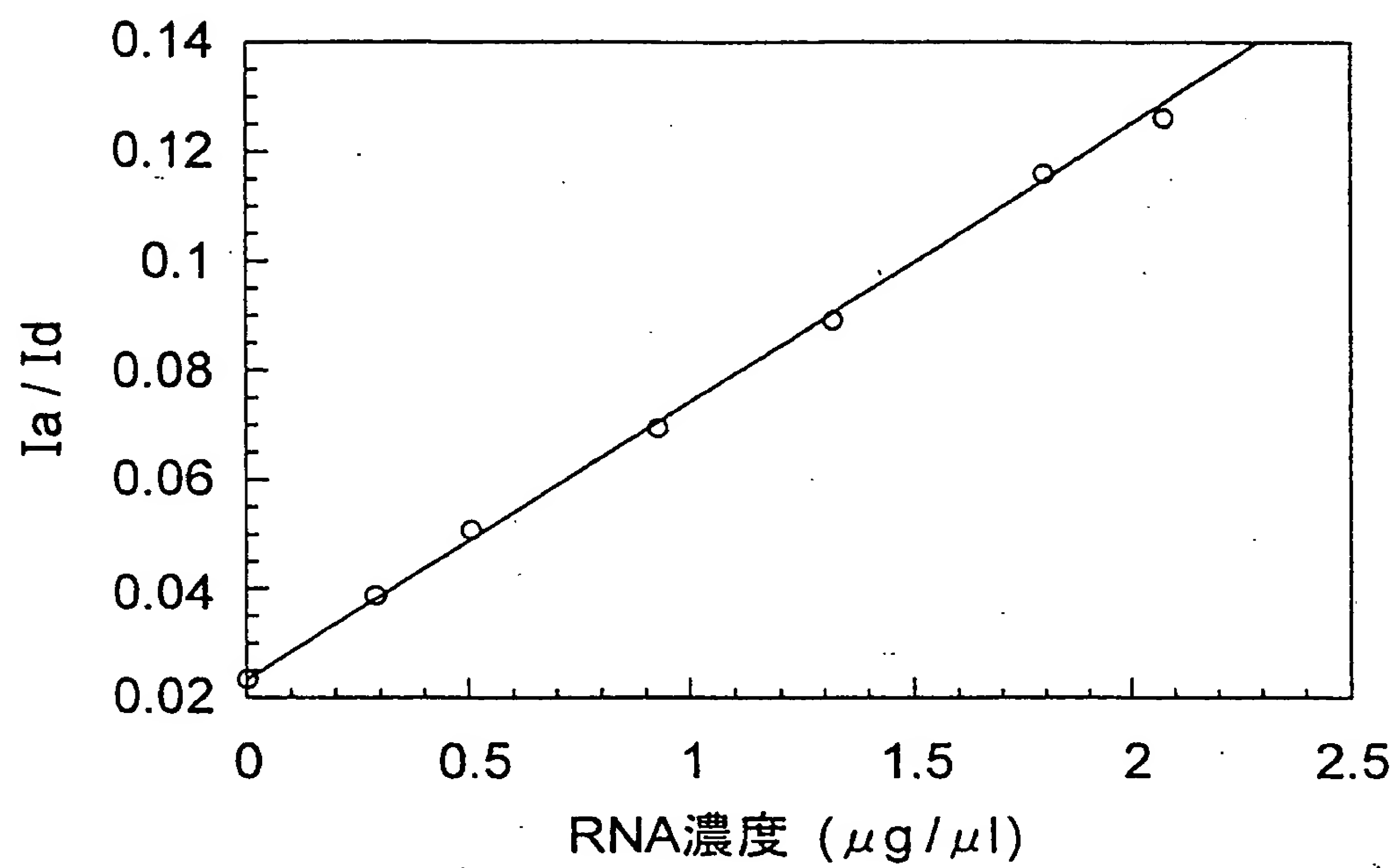


図15A

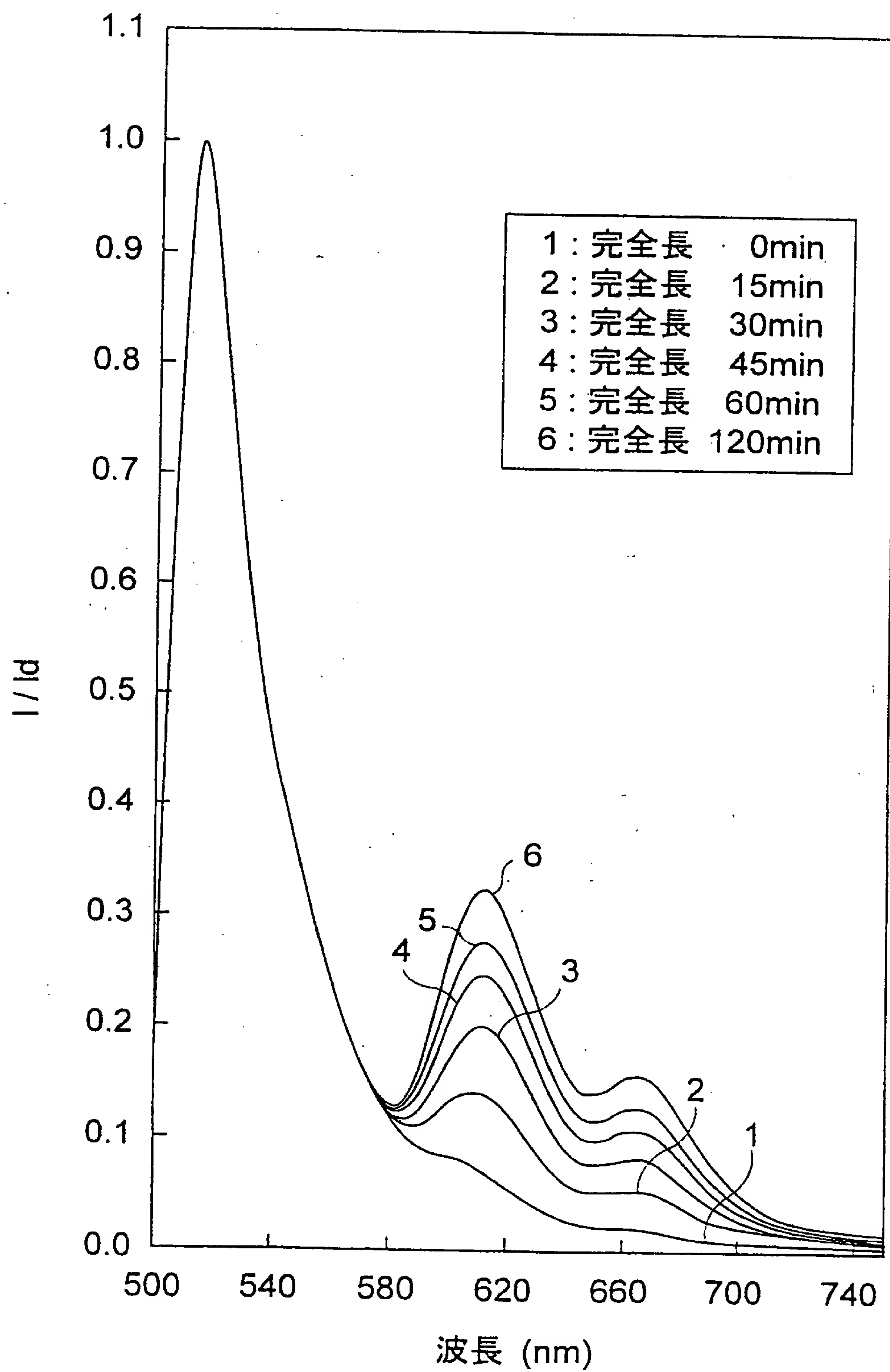


図15B

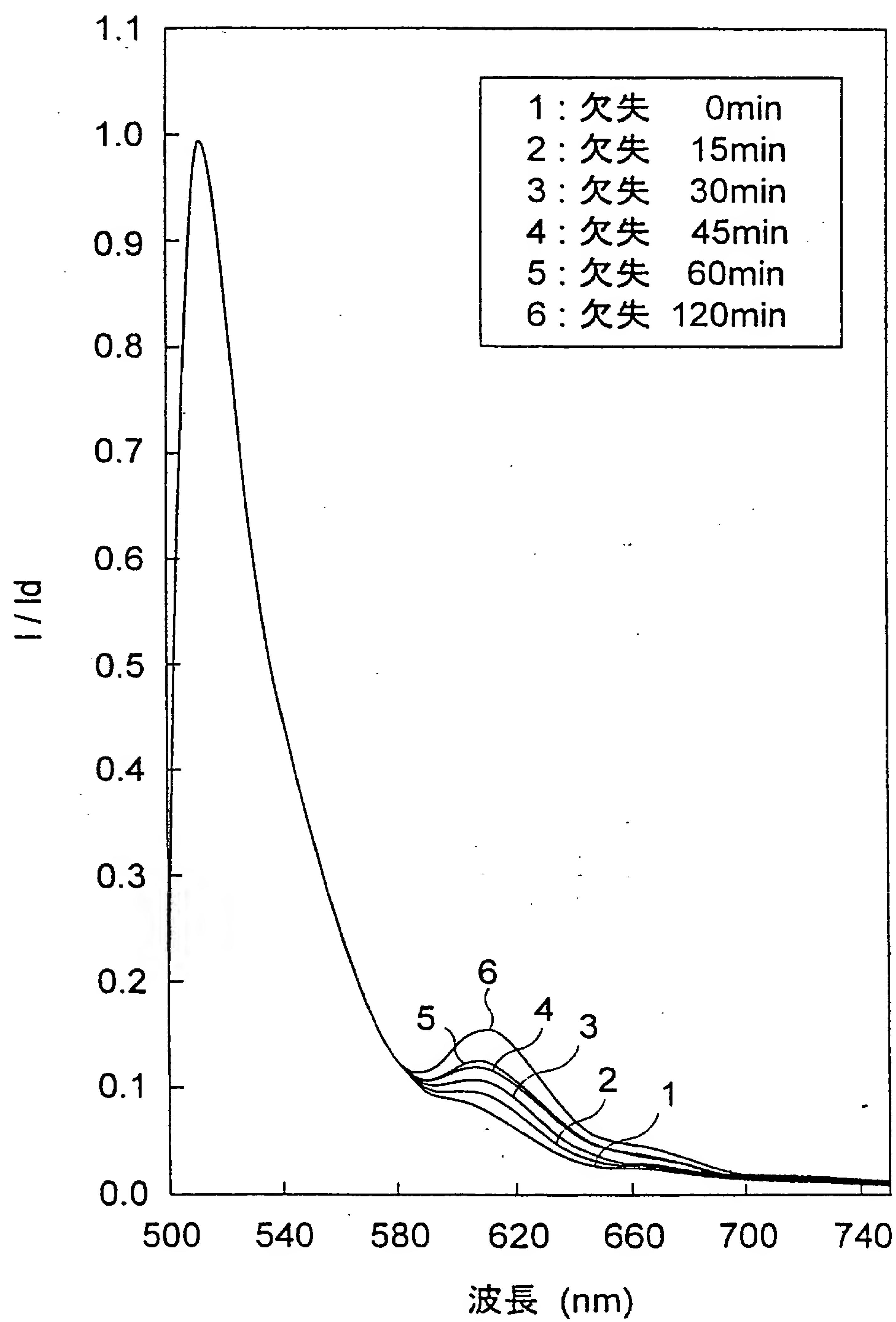


図16

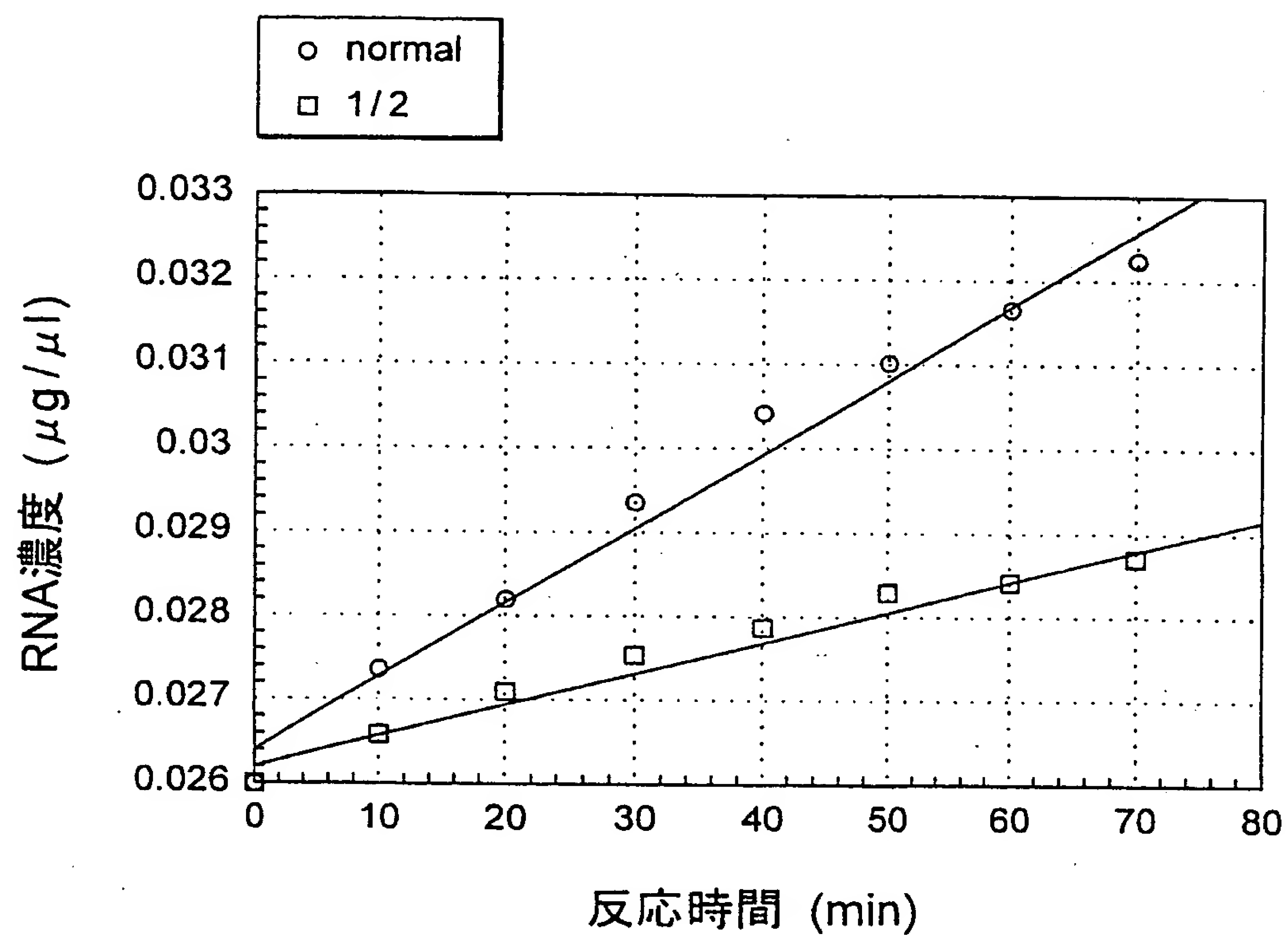


図17

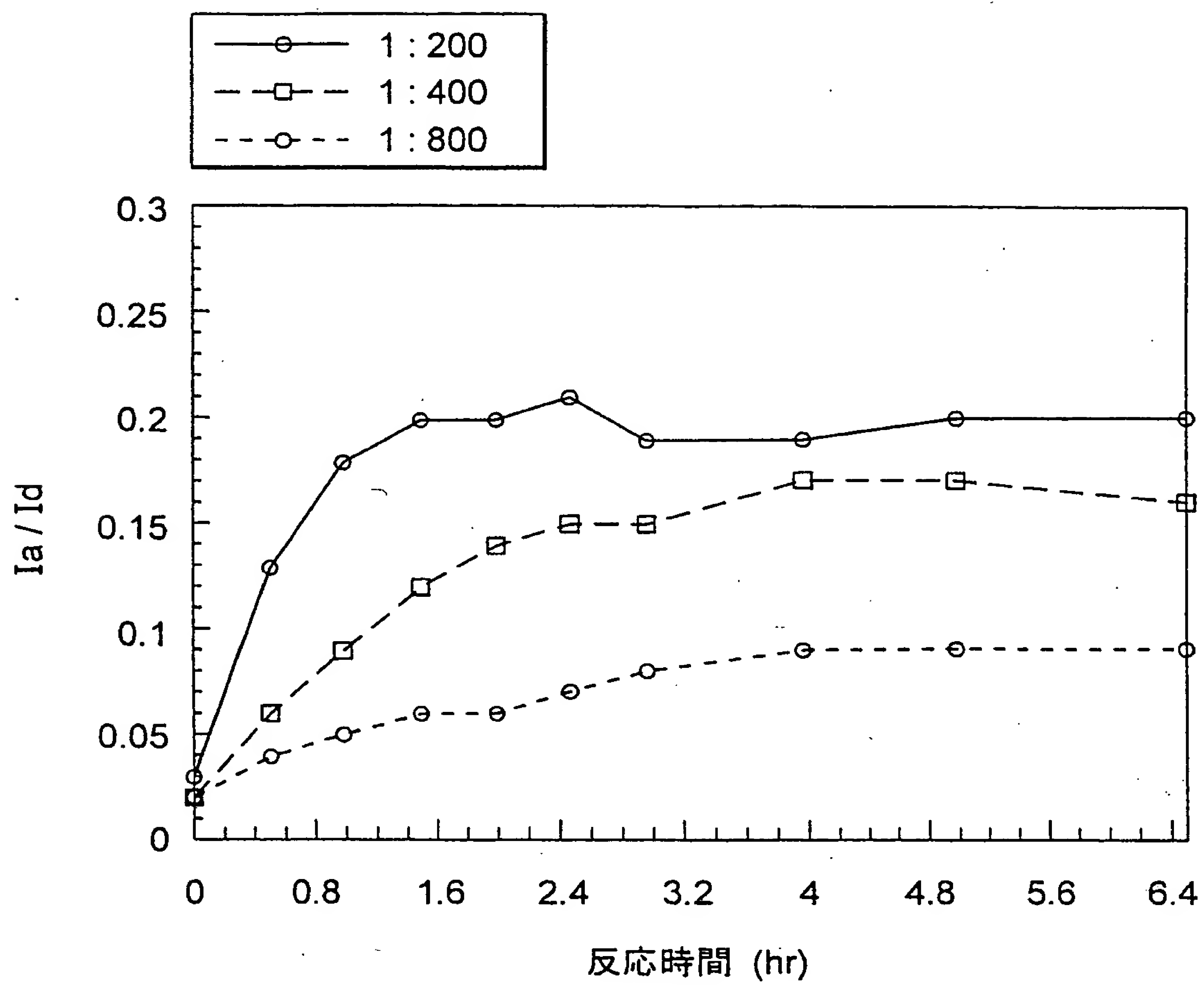


図18A

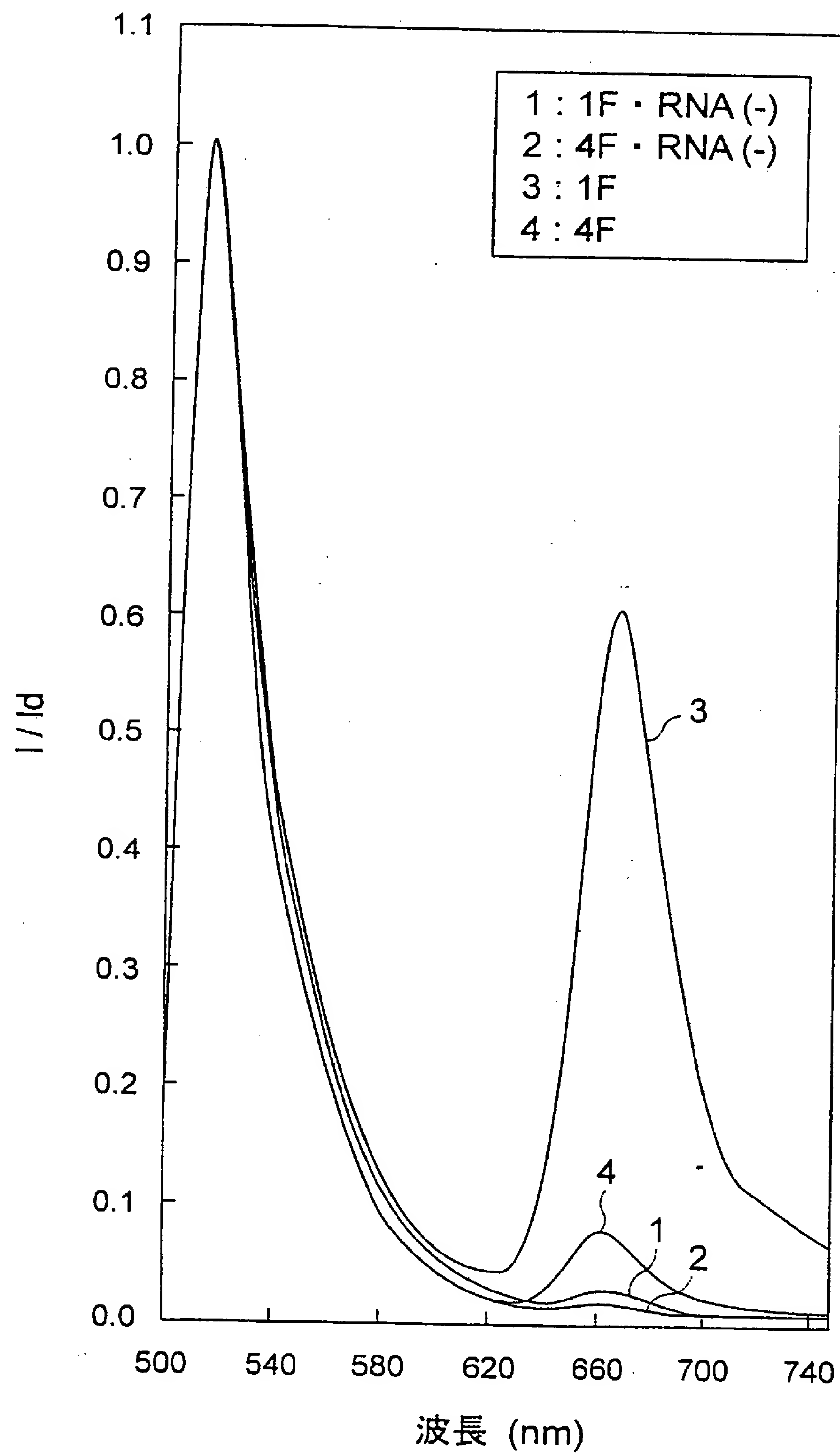


図18B

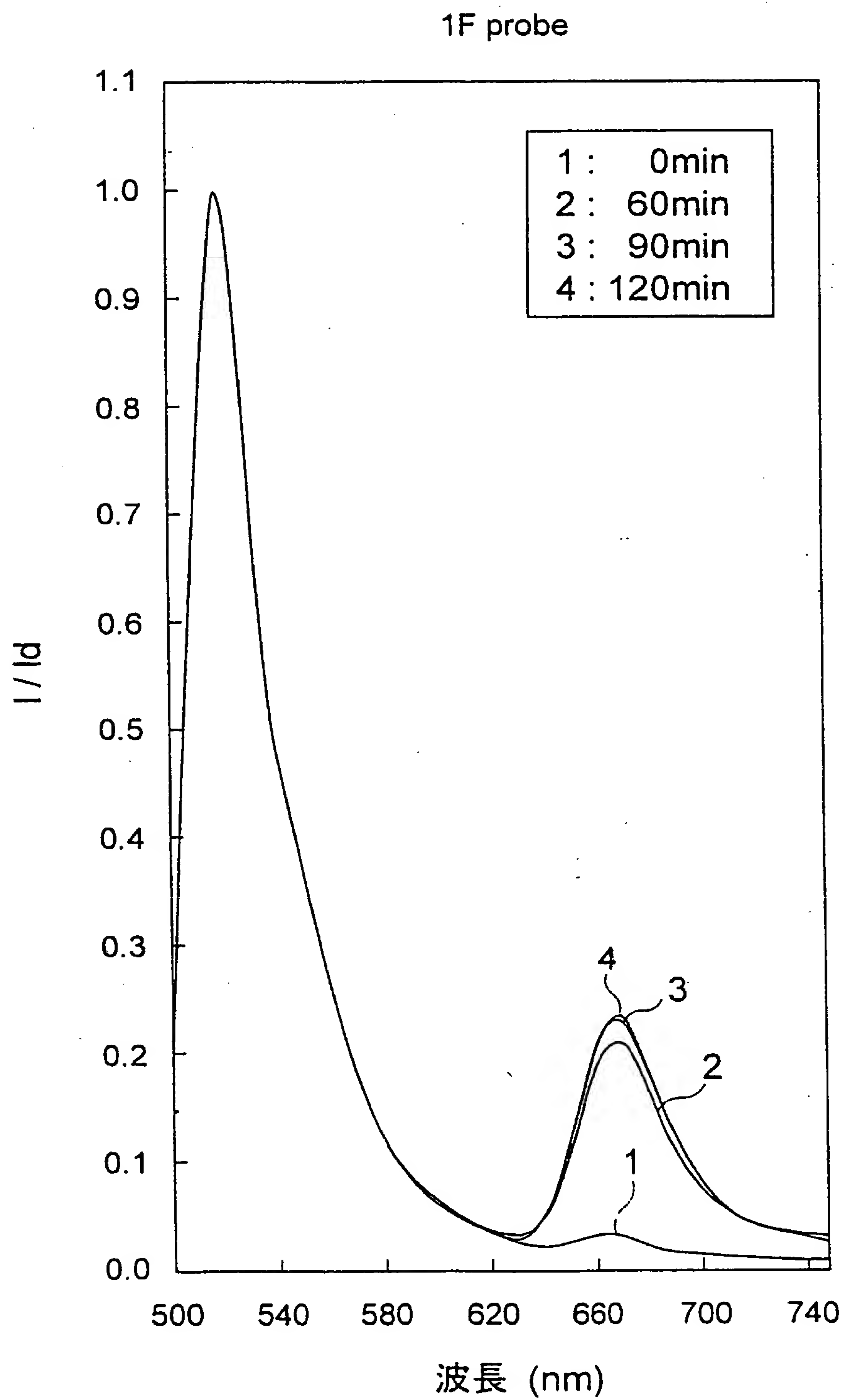
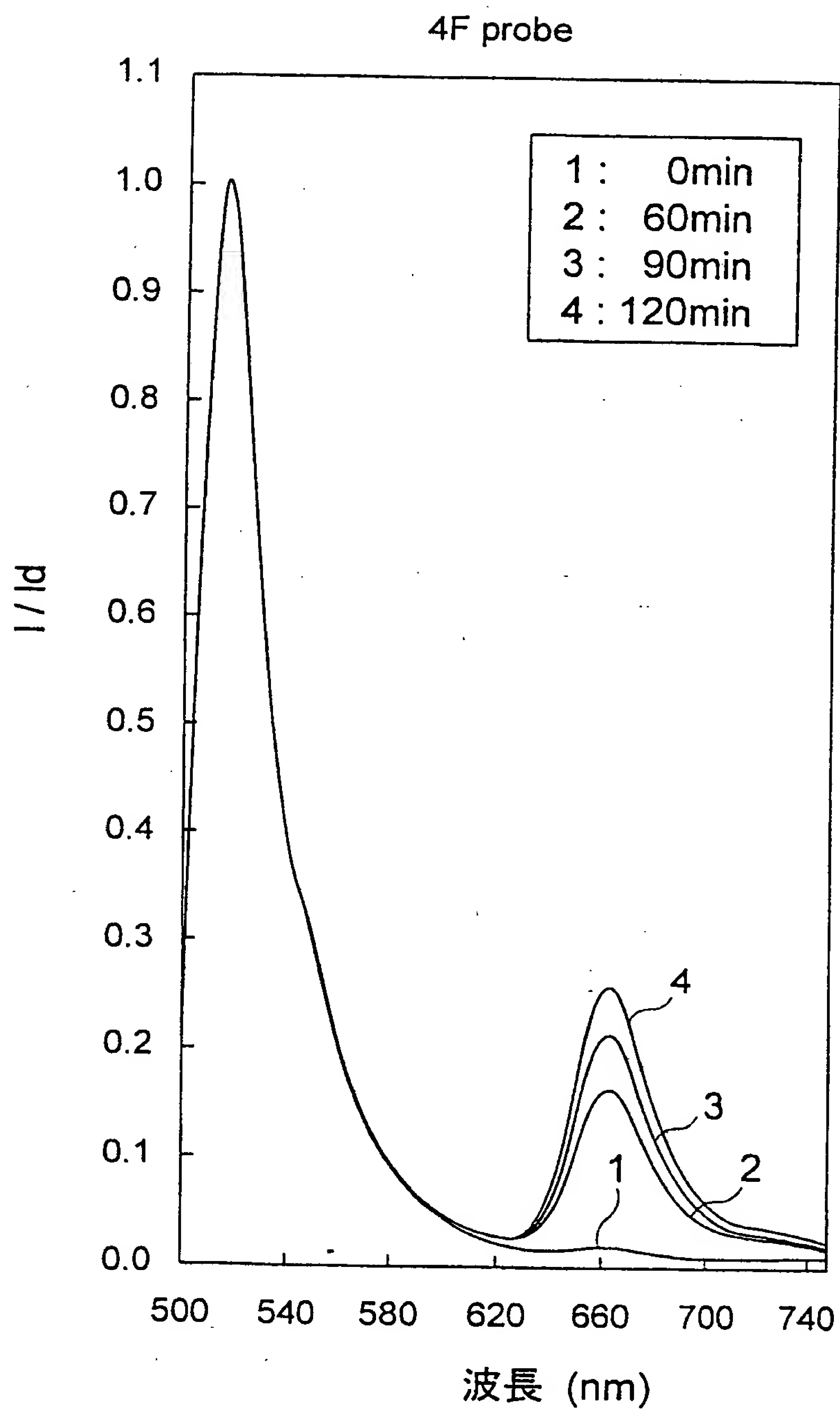


図18C



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00444

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | JP, 9-500280, A (University of Massachusetts Medical Center), January 14, 1997 (14. 01. 97) & EP, 712444, A | 1-4 |
| A | JP, 62-157570, A (Molecular Biosystems, Inc.), July 13, 1987 (13. 07. 87) & EP, 229943, A & US, 4996143, A | 1-4 |
| A | Exp. Cell Res., Vol. 238, No. 1 (1998) Jolly C., et al., "Contribution of growing RNA molecules to the nuclear transcripts foci observed by FISH", p.299-304 | 1-4 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
May 18, 1998 (18. 05. 98)Date of mailing of the international search report
May 26, 1998 (26. 05. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A | JP, 9-500280, A(ユニバーシティ・オブ・マサチューセッツ・メディカル・センター)14. 1月. 1997(14. 01. 97) &EP, 712444, A | 1-4 |
| A | JP, 62-157570, A(モレキュラー・バイオシスレムズ・インコーポレイテッド)13. 7月. 1987(13. 07. 87) &EP, 229943, A&US, 4996143, A | 1-4 |
| A | Exp. Cell Res., Vol. 238, No. 1(1998)Jolly C., et al.; "Contribution of growing RNA molecules to the nuclear transcripts foci observed by FISH", p. 299-304 | 1-4 |

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 05. 98

国際調査報告の発送日

26.05.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

